Zur Reaktion von N-1-Methylnicotinamidchlorid mit Arzneistoffen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Marianne Weidemann
aus Worms

1983

UNIV.
LONDON
MED.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0010

Zur Reaktion von N-1-Methylnicotinamidchlorid mit Arzneistoffen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Marianne Weidemann
aus Worms

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 1983
Dekan: Prof.Dr.J.Strähle
1.Berichterstatter: Prof.Dr.K.-A.Kovar
2.Berichterstatter: Prof.Dr.E.Graf

Die vorliegende Arbeit wurde im April 1979 unter Anleitung von Herrn Professor Dr.K.-A.Kovar am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im März 1983 abgeschlossen.

Ich danke Herrn Professor Dr.K.-A.Kovar sehr herzlich für die wertvollen Anregungen und seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Den Freunden und Kollegen danke ich für die Teilnahme
an Mißerfolgen und Erfolgen.
Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr.D.Friess für
die Mitarbeit bei der Isolierung der Substanzen.

"Woran arbeiten Sie?"
wurde Herr K. gefragt.
Herr K. antwortete:
"Ich habe viel Mühe,
ich bereite meinen
nächsten Irrtum vor."

Berthold Brecht

Abstract

Weidemann, Marianne

ZUR REAKTION VON N-1-METHYLNICOTINAMIDCHLORID MIT ARZNEISTOFFEN

N-1-Methylnicotinamidchlorid (NMN) wurde auf seine Verwendung zum fluorimetrischen Nachweis von ca. 90 Arzneistoffen mit aktiven Methylengruppen getestet. Unter den gewählten Bedingungen zeigten nur das Choleretikum DEHYDROCHOLSÄURE und das Sedativum ALONIMID eine ausreichend hohe Empfindlichkeit. Linearität herrscht im Bereich von 0,2 bis 2,5 µg DEHYDROCHOLSÄURE und 0,1 bis 1,5 µg ALONIMID pro ml Reaktionslösung. Die Nachweisgrenzen betrugen 50 ng DEHYDROCHOLSÄURE bzw. 2 ng ALONIMID pro ml Reaktionslösung im Vergleich zu 10 µg bzw. 85 ng bei der UV-Bestimmung. Die Berechnung der Variationskoeffizienten ergab Werte von 2,5% für DEHYDROCHOLSÄURE (2,2 µg/ml) und von 3,8% für ALONIMID (1,3 µg/ml). Der F-Test bestätigt die Übereinstimmung der fluorimetrischen Gehaltsbestimmung der DEHYDROCHOLSÄURE in DECHOLIN^{R}-Tabletten mit den Ergebnissen aus der Derivativspektroskopie. Die fluorimetrische Methode ist spezifischer und weitaus empfindlicher, so daß geringe Substanzmengen ohne vorherige Extraktion nachgewiesen werden können.

Die Strukturaufklärung (400MHz-^{1}H- und ^{13}C-NMR) der Reaktionsprodukte ergab im Gegensatz zu früheren Arbeiten von HUFF und von NAKAMURA und TAMURA in allen Fällen ein 2,7-Naphthyridinderivat.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung..... 1

2. Die Umsetzung von N-1-Methylnicotinamidchlorid (NMN) mit Aceton..... 5

2.1 ^{1}H-NMR-Untersuchung..... 5

2.2 ^{13}C-NMR-Untersuchung..... 13

3. Grundlagen zur qualitativen und quantitativen Auswertung der Fluoreszenz..... 22

4. Die Umsetzung von NMN mit Substanzen, die aktive Methylengruppen enthalten..... 28

5. Untersuchungen zur fluorimetrischen Bestimmung mit NMN..... 54

5.1 Dehydrocholsäure..... 54

5.1.1 Allgemeines zur Dehydrocholsäure..... 54

5.1.2 Quantitative fluorimetrische Bestimmung der Dehydrocholsäure..... 55

5.1.3 UV-Bestimmung..... 60

5.1.4 Vergleich der fluorimetrischen Methode mit einer UV-Bestimmung..... 61

5.1.5 Bestimmung des Dehydrocholsäuregehaltes in Tabletten..... 63

5.2 Alonimid..... 68

5.2.1 Quantitative fluorimetrische Bestimmung..... 68

5.2.2 UV-Bestimmung..... 72

5.2.3 Vergleich der fluorimetrischen Methode mit einer UV-Bestimmung..... 74

6. Strukturaufklärung der Hauptreaktionsprodukte.. 75

6.1 NMN mit Cyclohexanon..... 75

6.2 NMN mit 2-Decalon..... 79

6.3 NMN mit Dehydrocholsäure..... 84

6.4 NMN mit α-Tetralon..... 97

6.5 NMN mit Alonimid..... 100

Seite

7. Zusammenfassung..... 106

8. Experimenteller Teil..... 108

9. Anhang..... 145

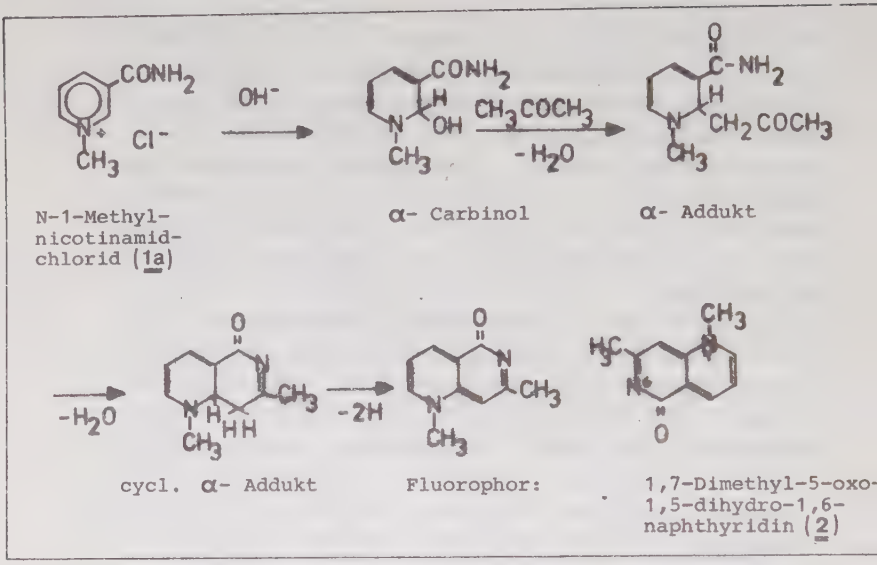
10. Literaturverzeichnis..... 181

1. Einleitung

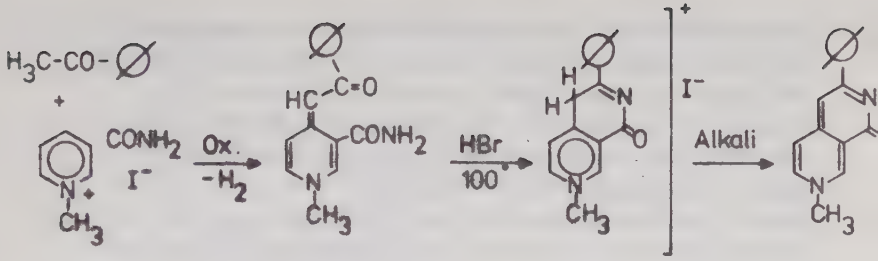
Aktive Methylenverbindungen lassen sich durch Farbreaktionen mit Polynitroaromaten empfindlich nachweisen. Diese meist als Namensreaktionen bekannten Umsetzungen zählen zum festen Bestandteil der pharmazeutischen Analytik und haben Eingang in verschiedene Pharmakopöen gefunden. Angeführt seien u.a. die Reaktion nach RAYMOND, KEDDE und BALJET auf Cardenolide[1], die CANBÄCK-Reaktion auf Hydromorphonderivate[2,3], die ZIMMERMANN-Reaktion auf Ketosteroide[4], die JAFFE-Reaktion auf Kreatinin[5] und die Reaktion der N-1-substituierten Benzodiazepine[6-8]. Noch empfindlicher als Farbreaktionen sind im allgemeinen fluorimetrische Bestimmungen. So wurde von NAKAMURA und TAMURA[9] 1978 eine neue spektrophotofluorimetrische Methode entwickelt. Dabei wird N-1-Methylnicotinamidchlorid (NMN) im alkalischen Milieu mit α-Methylencarbonylkomponenten ($-CH_2-CO-$) umgesetzt. Nach Zugabe von Ameisensäure und Erhitzen entsteht eine violette bis grüne Fluoreszenz. Dieser Nachweis basiert auf Veröffentlichungen von HUFF und Mitarb.[10-12] aus dem Jahre 1947. Allgemein konnten NMN im Urin und die Pyridinnukleotide im Blut durch Aceton bzw. aktive Methylenverbindungen nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden.

HUFF ging von einem nucleophilen Angriff des Hydroxids am Pyridiniumring in α-Stellung aus und schlug den Reaktionsmechanismus nach Formelschema 1 vor. Er postulierte die gefundene Struktur des Fluorophors als ein 1,6-Naphthyridinderivat, ließ jedoch einen endgültigen Beweis offen. NAKAMURA und TAMURA übernahmen unverändert die Formel 2; sie räumten allerdings die Möglichkeit einer anderen Struktur des Fluoreszenzproduktes ein, abgeleitet aus dem Angriff des Hydroxids in 4-Stellung am N-1-Methylnicotinamidchlorid zum γ-Addukt.

Formelschema 1

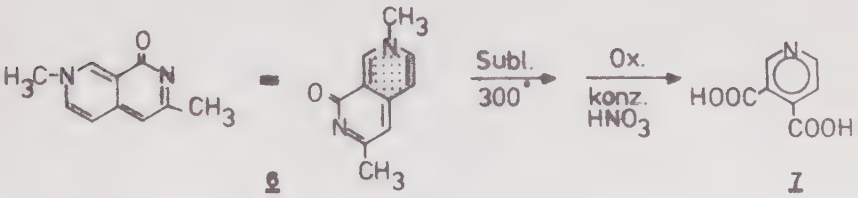


In den Jahren 1956 und 1957 ergaben Untersuchungen von verschiedenen Arbeitskreisen unabhängig voneinander, daß es sich bei der von HUFF vorgeschlagenen Struktur wohl nicht um ein 1,6-, sondern um ein 2,7-Naphthyridinderivat der Struktur 6 handeln müsse:
KRÖHNKE, ELLEGAST und BERTRAM[13] erhielten aus der Umsetzung von Nicotinsäureamid-iodmethylat mit Acetophenon in Gegenwart von p-Nitrosodimethylanilin die Verbindung 3, die durch Erhitzen mit Bromwasserstoffsäure in das 2,7-Naphthyridinderivat 4 überführt wurde. Aus dem Iodmethylat 4 entstand mit Alkali die "Dehydrobase" 5. KRÖHNKE lieferte damit einen ersten Hinweis auf einen nucleophilen Angriff am C-4 des N-Alkylpyridiniumsalzes.



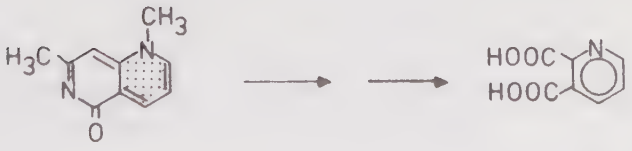
1b 3 4 5

BIRKOFER und KAISER[14] stellten den Fluorophor aus Aceton und NMN nach HUFF[10] erneut dar. Sie isolierten nach thermischer Zersetzung des Dimethyl-oxo-dihydronaphthyridins (6) und Oxidation des Sublimats 3-Methyl-1-oxo-1,7-dihydro-2,7-naphthyridin mit konz. Salpetersäure die Pyridin-3,4-dicarbonsäure(7)(Cinchomeronsäure). Da die Oxidation eines 1,6-Naphthyridinderivates (2) zur Pyridin-2,3-dicarbonsäure(8)(Chinolinsäure) hätte führen müssen, schien damit eine Reaktion des N-1-Methylnicotinamidchlorids nicht in 2-, sondern in 4-Stellung bewiesen.



6 I

nicht:



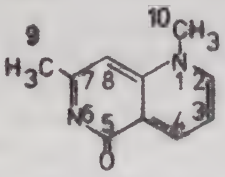
2 8

Demnach müßte man als Fluorophor ein 2,7-Naphthyridinderivat annehmen. Erstaunlicherweise übernehmen NAKAMURA und TAMURA 20 Jahre später wieder den ersten von HUFF vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus.
Da eine fluoreszenzspektroskopische Unterscheidung der beiden Naphthyridin-Strukturisomeren aufgrund ihrer Anregungs- und Emissionsspektren nicht geeignet ist, und in der Literatur bisher Angaben über kernresonanzspektroskopische Untersuchungen ganz fehlen, ist das Ziel dieser Arbeit, das Fluoreszenzprodukt erneut nach der Originalvorschrift von HUFF[10] zu synthetisieren und die Substanz sowohl ^{1}H- als auch ^{13}C-NMR-spektroskopisch zu vermessen. Darüberhinaus soll NMN als Reagens auf Verbindungen mit aktiven Methylengruppen geprüft und die Struktur der fluoreszierenden Endprodukte nach Möglichkeit aufgeklärt werden.

2. Die Umsetzung von N-1-Methylnicotinamidchlorid (NMN) mit Aceton

2.1 ^{1}H-NMR-Untersuchungen

Bei der von HUFF [10] vorgeschlagenen Struktur



würde man im ^{1}H-NMR-Spektrum

- ein ABM-System aufgrund der Kopplungen von H-2,3,4
- ein Singulett für ein olefinisches bzw. aromatisches Proton (H-8) in Abhängigkeit von der Mesomerie
- die beiden Singuletts der Methylgruppen

erwarten.

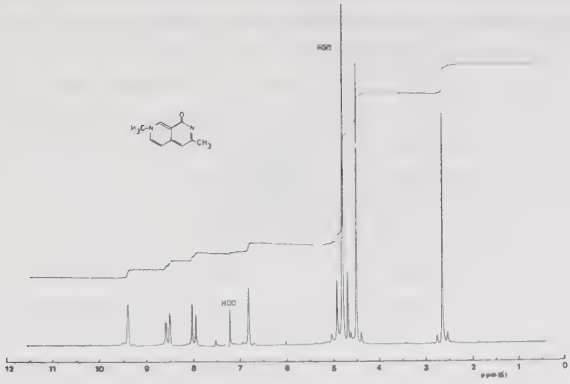
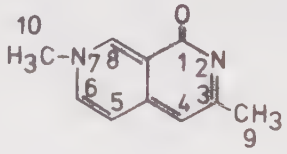


Abb.1: 80MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Kondensationsproduktes aus Aceton und N-1-Methylnicotinamidchlorid, in D_2O

Es ist kein ABM-System zu erkennen (Abb.1); stattdessen weist das Spektrum nur ein AB-System auf (bei 8.53 und 7.98 ppm mit J_{CH}= 7.5 Hz). Ferner lassen sich eindeutig eine C-CH_3-Gruppe bei 2.66 ppm sowie N-CH_3-Gruppe bei 4.50 ppm zuordnen. Zusätzlich finden sich im Spektrum zwei weitere Singuletts im Bereich olefinischer bzw. aromatischer Protonen (9.38 und 6.82 ppm), die mit keinen weiteren Protonen koppeln. Aufgrund des erhaltenen Protonenspektrums kann die vorgeschlagene Struktur nicht mit der tatsächlichen übereinstimmen. Basierend auf der Elementaranalyse von HUFF MG 210,66g und dem erhaltenen Massenspektrum (siehe Exp.Teil) muß die vorliegende Summenformel $C_{10}H_{10}N_2O \cdot HCl$ als richtig angesehen werden. Übereinstimmung der Struktur mit dem ^{1}H-NMR-Spektrum besteht im Vorhandensein einer N-CH_3- und einer C-CH_3-Gruppe, jedoch nicht eines ABM- sondern eines AB-Systems, und statt eines erwarteten olefinischen Protons werden zwei olefinische Protonen gefunden. Da nach der Elementaranalyse aber zwei Stickstoffatome enthalten sind, muß die relative Lage der beiden Stickstoffatome zueinander anders sein. Aufgrund des AB-Systems (2 olefinische Protonen) dürfte die 2,7-Naphthyridinstruktur zutreffen 6.



6

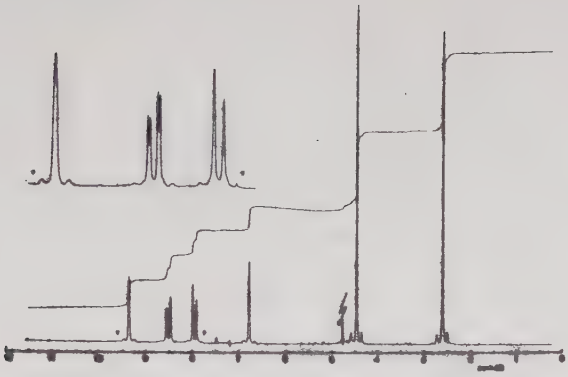
Tab.1: Zuordnung der ^{1}H-Resonanzen vom Kondensationsprodukt aus N-1-Methylnicotinamidchlorid und Aceton als Hydrochlorid (**6**)

ppm	Struktur des Signals	H-x	J (Hz)	Integration
9.38	s(t)	H-8	-	1H
8.53	dd	H-6	J_{ortho} = 7.5 J_{meta} = 1.25	1H
7.98	d	H-5	J_{ortho} = 7.5	1H
6.82	s(angesp.)	H-4	-	1H
4.50	s	$N-CH_3$	-	3H
2.66	s	$C-CH_3$	-	3H

Im Bereich aliphatischer Protonen erscheinen zwei scharfe Singuletts (Integration ergibt jeweils drei Protonen), wobei die bei tieferem Feld absorbierende Methylgruppe im für $N-CH_3$-Gruppen charakteristischen Bereich in Resonanz tritt; während die Methylgruppe am C-3 gegenüber reinen aliphatischen Methylgruppen durch den induktiven Effekt des benachbarten Stickstoffs sowie der ebenfalls (zur Methylgruppe) benachbarten C=C-Doppelbindung bei tieferem Feld erscheint. Die bei 9.38 und 6.82 ppm auftretenden Signale müssen Protonen ohne direkten Kopplungspartner (H-8 und H-4) entsprechen, wobei das bei tieferem Feld auftretende Signal dem durch den benachbarten Stickstoff entschirmten Proton H-8 zugeordnet wird. Bei genauerer Betrachtung des dem H-8 zugeordneten Signals fällt auf, daß diese Resonanz schwach zu erkennende Fernaufspaltungen zeigt (scheinbares Triplett, offenbar resultierend aus der Überlagerung zweier Dubletts mit unterschiedlichen Kopplungskonstanten).

Wie die Analyse des für H-8 gefundenen Kopplungssystems ergibt, handelt es sich hierbei um ein Dublett von 1.25 Hz, dem ein weiteres Dublett von etwa 0.5 Hz überlagert ist. Hieraus geht eine weitgehende Übereinstimmung der Fernkopplungskonstanten mit dem einen Teil des AB-Systems (H-6) hervor. Somit handelt es sich bei der Fernkopplungskonstanten von 1.25 Hz um die wechselseitige Kopplung von H-6 mit H-8. H-6 absorbiert demnach bei 8.53 ppm (dd). Neben der Kopplung über vier Bindungen mit H-8 weist das Signal von H-6 eine weitere deutlich erkennbare Kopplung mit H-5 auf ($^3J_{H-6,H-5}$= 7.5 Hz). Ebenso koppelt H-5 mit H-6 mit der gleichen Kopplungskonstanten (7.5 Hz); es formt im Spektrum ein Dublett ohne weitere Fernaufspaltungen in Analogie zu H-4. Somit kann die Zuordnung der Signale von H-6 bzw. H-5 als weitgehend gesichert angesehen werden. Offen bleibt bis jetzt die neben der Kopplung mit H-6 weiterhin bestehende Kopplung von etwa 0.5 Hz (Dublettaufspaltung) von H-8. Dabei handelt es sich mit allergrößter Wahrscheinlichkeit um eine Kopplung mit H-N-7, da die untersuchte Verbindung als Hydrochlorid vorliegt. Aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum des Kondensationsproduktes geht demnach hervor, daß die Protonenanlagerung bei der Hydrochloridbildung am N-7 eingetreten ist. Dies läßt sich durch Überlegungen bezüglich der Basizität der beiden im Molekül vorhandenen Stickstoffatome erklären, da der Lactamstickstoff infolge der benachbarten Carbonylfunktion eine geringere Elektronendichte und deshalb geringere Basizität aufweist.
Zur Überprüfung der Richtigkeit der oben getroffenen Zuordnungen wurden "Homonuclear-Decoupling" Experimente durchgeführt. Die Einstrahlung erfolgte beginnend beim äußersten linken Signal des Spektrums und wurde nach rechts fortgesetzt. Die Leistung des Entkopplers betrug jeweils 2×10^{-4} Watt (Abb.2).

a)



b)

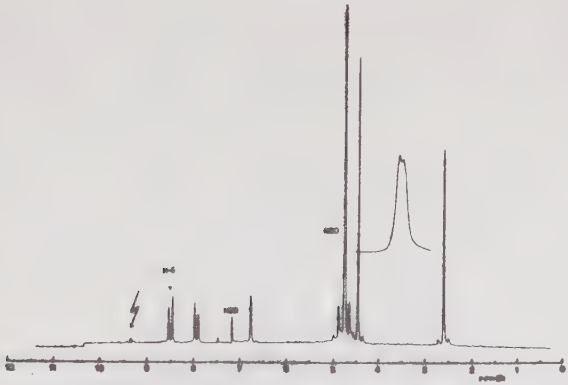
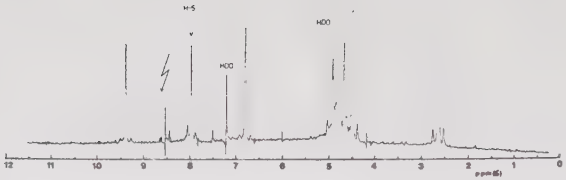


Abb.2: 80-MHz-^{1}H-NMR-Spektren des Kondensationsproduktes 6, in D_2O, Entkopplerleistung 2 x 10^{-4} Watt
a) Gesamtspektrum, D_2O entkoppelt bei 4.67 ppm
b) Signalentkopplung bei 9.38 ppm

c)



d)

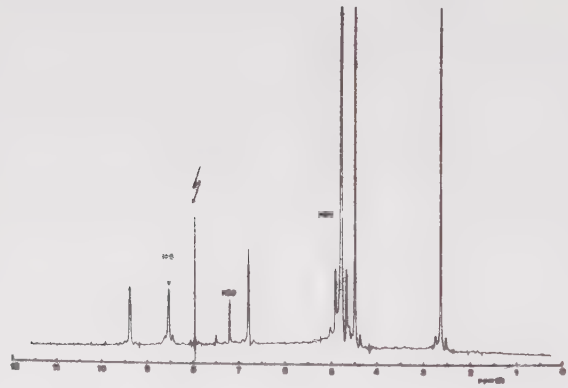
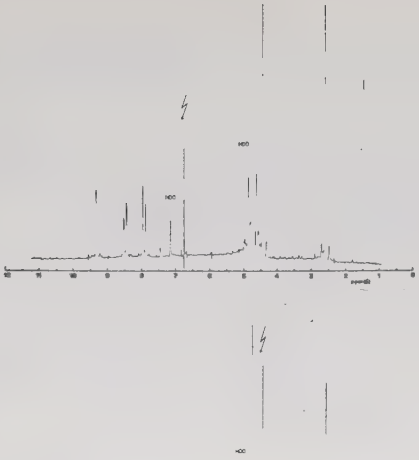


Abb.2c,d: c) Signalentkopplung bei 8.53 ppm
d) Signalentkopplung bei 7.98 ppm

e)



f)

g)

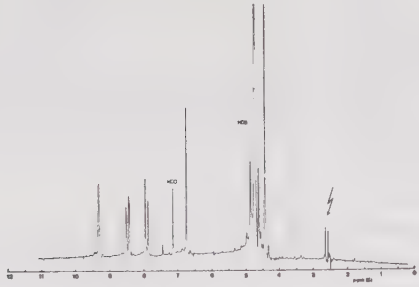


Abb.2e-g: e) Signalentkopplung bei 6.82 ppm
f) Signalentkopplung bei 4.50 ppm
g) Signalentkopplung bei 2.66 ppm

Aus dieser Spektrenfolge läßt sich folgendes Schema gewinnen:

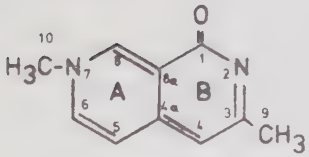
Tab.2: Einstrahlungsexperimente beim Kondensationsprodukt aus NMN und Aceton als Hydrochlorid (6)

Die Einstrahlung erfolgte auf Signalgruppe	Signal vor der Einstrahlung	Signal nach der Einstrahlung
1	H-6 dd	H-6 d (^{3}J= 7.5Hz)
2	H-5 d	H-5 s
3	H-6 dd	H-6 s (m)
4	-	-
5	-	-
6	-	-

Durch die Homonuclear-Decoupling-Experimente konnten die vorher dargestellten wechselseitigen Kopplungen bestätigt werden, wodurch die Struktur eines 2,7-Naphthyridinderivates bezüglich der relativen Lage der Wasserstoffatome zueinander als gesichert angesehen werden kann.
Zur weiteren Überprüfung der gefundenen, im Widerspruch zu der von der japanischen Arbeitsgruppe übernommenen Struktur des Fluoreszenzproduktes aus N-1-Methylnicotinamidchlorid und Aceton, wird die Substanz zur direkten Analyse des Kohlenstoffgerüstes darüberhinaus ^{13}C-kernresonanzspektroskopisch charakterisiert.

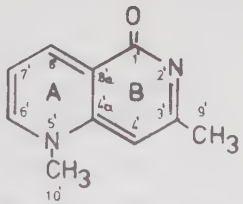
2.2 ^{13}C-NMR-Untersuchungen

Die Interpretation des ^{13}C-NMR-Spektrums basiert auf folgenden Überlegungen: Für die beiden bereits oben angegebenen Strukturen des Kondensationsproduktes - des 3,7-Dimethyl-1-oxo-1,7-dihydro-2,7-naphthyridins auf der einen und des 1,7-Dimethyl-5-oxo-1,5-dihydro-1,6-naphthyridins auf der anderen Seite - muß sich anhand der ^{13}C-Kernresonanzspektroskopie ein charakteristischer Unterschied bezüglich der Kopplung bzw. der Aufspaltungsmuster der einzelnen Kohlenstoffatome feststellen lassen. Zur Verdeutlichung gemeinsamer Strukturelemente sei das 1,6-Naphthyridinderivat nicht gemäß der IUPAC-Nomenklatur dargestellt.
Die Protonierung bei der Salzbildung wird am Enamin-Stickstoff zugrundegelegt.



2,7-Naphthyridinderivat

6



1,6-Naphthyridinderivat

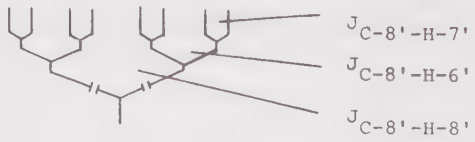
2

Für die Argumentation kann jeweils nur der Ring A aus der Verbindung 6 und aus 2 herangezogen werden, da die Ringe 6B und 2B identisch sind und somit auch gleiche Kopplungen im ^{13}C-NMR-Spektrum aufweisen müssen.
In Tabelle 3 sind die theoretisch möglichen Fernkopplungen der Ringe A für beide Formeln aufgeführt.

Tab.3: Theoretisch mögliche Fernaufspaltungen der Naphthyridinderivate 6 und 2

6			2		
4a	S	^2J(H-4), ^2J(H-5), ^3J(H-6), ^3J(H-8)	4a'	S	^2J(H-4'), ^2J(N-H), ^3J(H-8'), ^3J(CH_3-10'), ^3J(H-6')
5	D	^2J(H-6), ^3J(H-4), ^3J(N-H)	5'	-	
6	D	^2J(H-5), ^2J(N-H), ^3J(H-8), ^3J(CH_3-10)	6'	D	^2J(H-7'), ^2J(N-H), ^3J(H-8'), ^3J(CH_3-10')
7	-		7'	D	^2J(H-6'), ^2J(H-8'), ^3J(N-H)
8	D	^2J(N-H), ^3J(H-6), ^3J(CH_3-10)	8'	D	^2J(H-7'), ^3J(H-6')
8a	S	^2J(H-8), ^3J(H-5), ^3J(H-4), ^3J(N-H)	8a'	S	^2J(H-8'), ^3J(H-7'), ^3J(H-4'), ^3J(N-H)

Der auffallendste Unterschied muß demnach für das Signal des C-8 bzw. C-8' Kohlenstoffatoms auftreten. Für C-8' wird eine ^{3}J-CH-Fernkopplung mit H-6' von etwa 7-10 Hz und eine ^{2}J-Fernkopplung mit H-7' von etwa 1-4 Hz erwartet. Daraus resultiert ein Dublett von Doppeldubletts mit folgendem Aufspaltungsmuster



also ein sehr einfaches und scharfes Signal. Vergleicht man die Signalmultiplizitäten im gemessenen ^{13}C-NMR-Spektrum, so

findet man kein Signal ähnlich einfacher Aufspaltung. Alle Resonanzen zeigen eine sehr viel höhere Multiplizität. Wie bereits vorher in der ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie bewiesen, führt ein Vergleich des ^{13}C-NMR-Spektrums mit den zur Diskussion stehenden Substanzen ebenfalls auf das 2,7-Naphthyridinderivat als Kondensationsprodukt aus N-1-Methylnicotinamidchlorid und Aceton. Der Angriff des Hydroxidions am Pyridiniumring in γ-Stellung hat sich bestätigt.
Für die vollständige Zuordnung der einzelnen Kohlenstoffresonanzen werden die Verschiebungen des Tetralin/ α-Tetralon und des 2,7-Naphthyridingrundgerüstes angewandt.

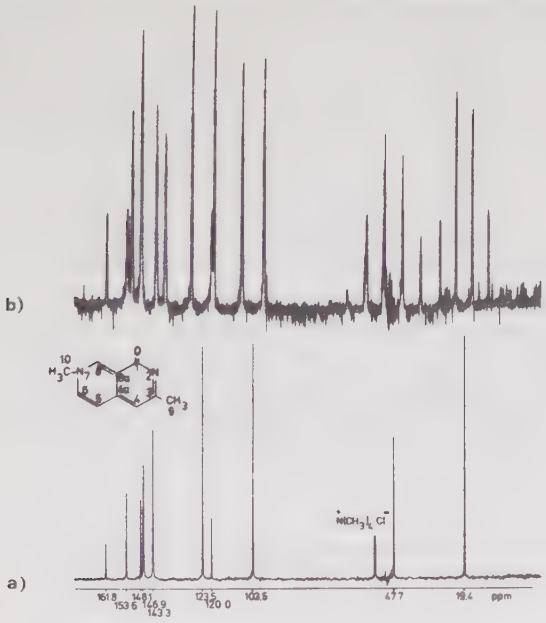
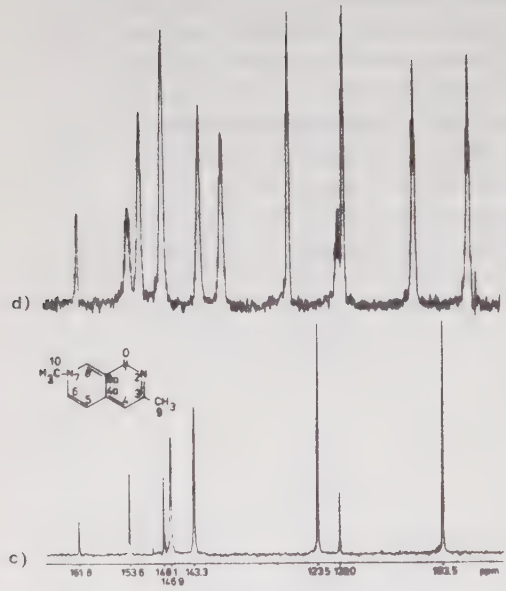


Abb.3: ^{13}C-NMR-Spektren des Kondensationsproduktes aus NMN und Aceton als Hydrochlorid, Tetramethylammoniumchlorid als Standard, in D_2O
a) ^{13}C-$\{^{1}H\}$-breitbandentkoppeltes Spektrum
b) alternierend gepulstes Doppelresonanzspektrum



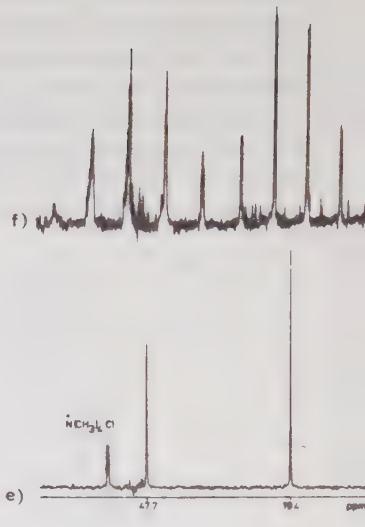
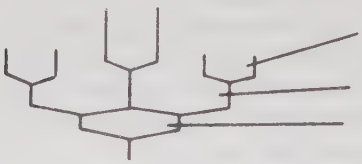


Abb.3 c)-f): c) gespreizter Aromatenteil von Abb.3 a)
d) gespreizter Aromatenteil von Abb.3 b)
e) gespreizter Aliphatenteil von Abb.3 a)
f) gespreizter Aliphatenteil von Abb.3 b)

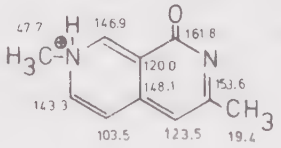
Das ^{13}C-Spektrum (Abb.3) zeigt wie erwartet insgesamt 4 Singuletts, 4 Dubletts und 2 Quartetts. Die beiden Quartetts im aliphatischen Bereich bei 47.7 und 19.4 ppm sind den zwei Methylgruppen der Verbindung zuzuordnen, wobei die bei tieferem Feld absorbierende Methylgruppe (C-10) mit einer großen Kopplungskonstanten von 140 Hz im charakteristischen Bereich für $N-CH_3$-Gruppen in Resonanz tritt. Die Fernaufspaltung ist schwer zu erkennen, da

das Signal von dem des internen Standards Tetramethylammoniumchlorid überlagert wird. Das scheinbare Triplett resultiert offenbar aus der zweifachen Kopplung der Methylgruppe mit den Protonen H-8 und H-6 mit gleicher Kopplungskonstante (dd, etwa 4 Hz). Die Methylgruppe (CH_3-9) am C-3 ist gegenüber reinen aliphatischen Methylgruppen infolge des induktiven Effektes des benachbarten Stickstoffatoms weiter entschirmt und erscheint bei höheren ppm. Das Quartett zeigt eine reine Dublettfernaufspaltung von 4 Hz durch Kopplung der Methylgruppe mit H-4.
Im Aromatenbereich des breitbandentkoppelten Spektrums findet man acht Signale für die acht Gerüstkohlenstoffe. Das Singulett bei 161.8 ppm ist dem Carbonyl-Kohlenstoff zuzuordnen. Da es sich hier um eine Säureamidteilstruktur handelt, ist das Signal im Vergleich zu einfachen Carbonylresonanzen durch den mesomeren Effekt des Stickstoffatoms stark abgeschirmt und auffallend nach höherem Feld verschoben.
Durch einen Vergleich mit 2,7-Naphthyridin[15] gelingt die Zuordnung des C-3 als Singulett bei 153.6 ppm. Das Signal läßt eine Fernaufspaltung in ein Quartett von Dubletts infolge der Resonanz mit der Methylgruppe und dem Proton H-4 ($^2J_{CH}$) erkennen. Die zwei noch verbleibenden quartenären Kohlenstoffatome C-4a und C-8a - gleichzeitig Brücken-Kohlenstoffe - weisen ebenso wie die bereits besprochenen C-1 und C-3 eine verminderte Intensität im ^{13}C-Spektrum auf (120.0 und 148.1 ppm). Im Vergleich der ^{13}C-Verschiebungen von Tetralin zum α-Tetralon[16] wird durch Einführen der Keto-Gruppe in C-1-Stellung der Kohlenstoff C-8a abgeschirmt und der C-4a entsprechend entschirmt. Daraus ergibt sich für C-4a die Absorption bei 148.1 ppm und für C-8a bei 120.0 ppm (im Vergleich dazu: 2,7-Naphthyridin C-4a bei 138.5 und C-8a bei 124.3 ppm). Über die Multiplizität des Signals bei 148.1 ppm kann infolge Überlappung keine Aussage getroffen werden. Die Multiplizität für

C-8a bei 120.0 ppm ist sehr komplex; scheinbares Ferntriplett (Doppeldublett mit gleicher Kopplungskonstante) von Dubletts.



Das Dublett-Signal bei 123.5 ppm entspricht weitgehend dem aus dem 2,7-Naphthyridin bekannten Wert für das C-4-Atom. Es zeigt eine scheinbare Multiplettaufspaltung durch Kopplung mit H-5 und der Methylgruppe am C-3 von 2-3 Hz. Das Signal bei 103.5 ppm spaltet in ein Dublett von Ferntripletts auf und wird dem Kohlenstoff C-5 zugeordnet. Dieser koppelt über drei Bindungen mit H-4 und über zwei mit H-6. Die noch verbleibenden Dubletts bei 146.9 und 143.3 ppm müssen auf C-6 und C-8 verteilt werden, deren chemische Verschiebung keine große Differenz aufweist. Für das Kohlenstoffatom C-6 ist eine höhere Fernaufspaltung zu erwarten als für C-8 (C-6: $^2J_{C-6-H-5}$, $^3J_{C-6-CH_3-10}$, $^3J_{C-6-H-8}$ und eventuell $^2J_{C-6-NH}$;
C-8 dagegen: $^3J_{C-8-H-6}$, $^3J_{C-8-CH_3-10}$ und eventuell $^2J_{C-8-NH}$).
Aus diesen Überlegungen heraus wird dem Kohlenstoff C-6 das komplexere Signal bei 143.3 ppm und C-8 dasjenige bei 146.9 ppm zugeordnet, wobei jedoch die Zuordnung austauschbar bleibt.



Mit Hilfe der Signalintensitäten, Kopplungskonstanten und Intensitäten läßt sich folgende Zuordnung tabellieren:

Tab.4: ^{13}C-Signalzuordnungen der Verbindung 6

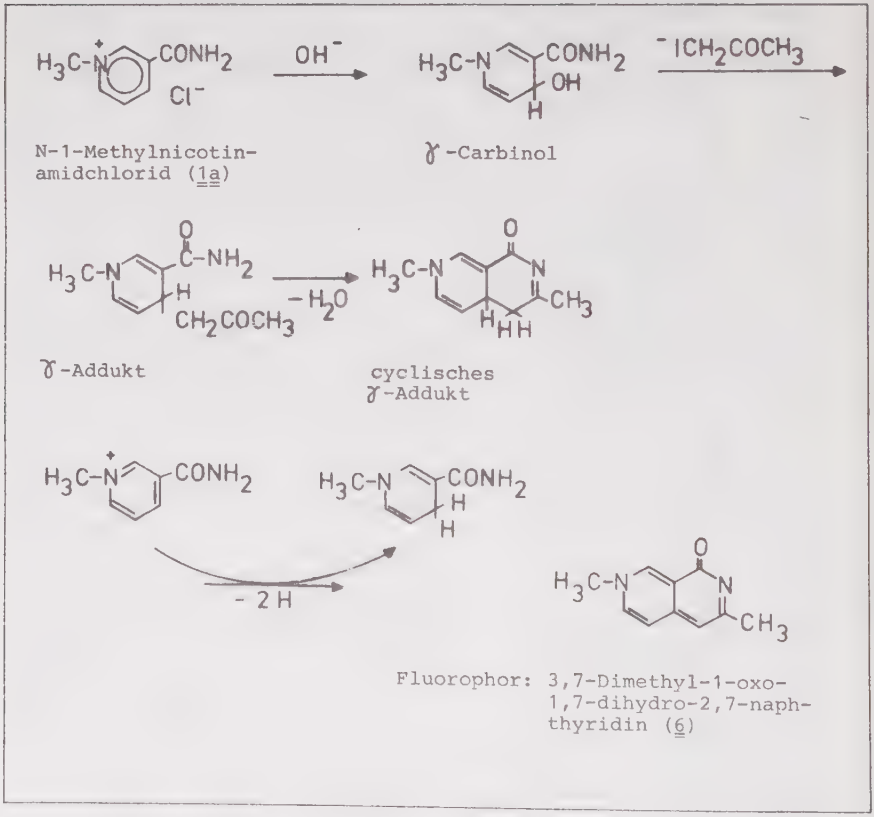
ppm	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
161.8*	Singulett	-	C-1
153.6*	Singulett von Fernquartetts von Ferndubletts	$^2J_{C-3-CH_3-9}$ = 1-2 Hz $^2J_{C-3-H-4}$	C-3
148.1*	Singulett	infolge Überlappung nicht auswertbar	C-4a
146.9	Dublett von Fernmultipletts	$^1J_{C-8-H-8}$ = 184 Hz	C-8$^+$
143.3	Dublett von Fernmultipletts	$^1J_{C-6-H-6}$ = 184 Hz	C-6$^+$
123.5	Dublett von Fernmultipletts	$^1J_{C-4-H-4}$ = 168 Hz $^3J_{C-4-H-5}$ = $^3J_{C-4-CH_3-9}$ = 2-3 Hz	C-4
120.0*	Singulett von Ferntripletts (Ferndoppeldublett mit gleichen Kopplungskonstanten) von Ferndubletts	$^3J_{C-8a-H-5}$ = 4 Hz $^3J_{C-8a-H-4}$ = 4 Hz $^2J_{C-8a-H-8}$ = 1-2 Hz	C-8a
103.5	Dublett von Ferntripletts	$^1J_{C-5-H-5}$ = 168 Hz $^2J_{C-5-H-6}$ = $^3J_{C-5-H-4}$ = 4 Hz	C-5
47.7	Quartett von Ferntripletts	$^1J_{C-10-H-10}$ = 140 Hz $^3J_{C-10-H-6}$ = $^3J_{C-10-H-8}$ = 4 Hz	C-10 ($N-CH_3$)
19.4	Quartett von Ferndubletts	$^1J_{C-9-H-9}$ = 125 Hz $^3J_{C-9-H-4}$ = 4 Hz	C-9 ($C-CH_3$)

* quarternäre Kohlenstoffatome mit geringer Intensität

$^+$ Zuordnung austauschbar

Bei der Konstitutionsaufklärung des Kondensationsproduktes aus Aceton und N-1-Methylnicotinamidchlorid konnte die von HUFF vorgeschlagene und von der japanischen Arbeitsgruppe 1979 übernommene Struktur eines 1,7-Dimethyl-5-oxo-1,5-dihydro-1,6-naphthyridins nicht bestätigt werden; vielmehr wurde als Fluoreszenzprodukt das 3,7-Dimethyl-1-oxo-1,7-dihydro-2,7-naphthyridin identifiziert. Die eindeutige Zuordnung als 2,7-Naphthyridinderivat und nicht eines 1,6-Naphthyridinderivates gelang anhand der ^{1}H-NMR-Spektroskopie und der ^{13}C-Messungen.
Der Reaktionsweg dürfte demnach analog Formelschema 2 ablaufen:

Formelschema 2



Im alkalischen Milieu kommt es unter Ausbildung eines γ -Carbinols des N-1-Methylnicotinamidchlorids zur Anlagerung des Acetoncarbanions zum γ-Addukt. Dieses kondensiert zum cyclischen γ-Addukt, welches unter Reduktion von weiterem NMN zum Fluorophor oxidiert wird.

3. Grundlagen zur qualitativen und quantitativen Auswertung der Fluoreszenz

Geschieht die Energieaufnahme der Atome oder Moleküle durch Absorption von ultraviolettem, sichtbarem oder infrarotem Licht, spricht man bei der emittierten Strahlung von Photolumineszenz. Photolumineszenzphänomene, d.h. Absorption von Licht einer bestimmten Frequenz, gefolgt von der Emission bei einer anderen Frequenz, unterteilt man in Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Unterscheidungskriterien sind die Abklingdauer, die Temperaturabhängigkeit (Phosphoreszenz wird meist nur bei tieferen Temperaturen beobachtet) und die Art des elektronischen Zustandes, von dem aus die Emission erfolgt - also Singulett oder Triplett. Die Aufnahme oder Abgabe von Strahlungsenergie kann nur in endlichen Einheiten, sog. Quanten ablaufen und ist durch die EINSTEIN-Beziehung (1) gegeben.

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \qquad (1)$$

E = Energie
h = Planck'sche Wirkungskonstante
ν = Frequenz
λ = Wellenlänge

Die durch Energieaufnahme bewirkten Veränderungen im Elektronengefüge angeregter Moleküle sind von kurzer Dauer. Sie führen entweder zu thermischer Energieumwandlung als strahlungslose Übergänge, zu Spaltungen von Molekülbindungen oder zur Wiederausstrahlung von Energie als Fluoreszenz oder Phosphoreszenz[17].
Ein JABLONSKI-Termschema (Abb.4) ist die Darstellung der Energieniveaus aller Elektronen des Moleküls, die nach der Quantentheorie möglich (erlaubt) sind und charakterisiert damit die spektroskopischen Eigenschaften. Denn jedem

Übergang zwischen zwei Termen entspricht eine definierte Energiedifferenz, die zugleich die Wellenlänge und Frequenz der aufgenommenen oder abgegebenen Strahlung (Farbe des Lichtes) bestimmt. Die Intensität der Strahlung wird dagegen von der Häufigkeit eines solchen Überganges festgelegt.

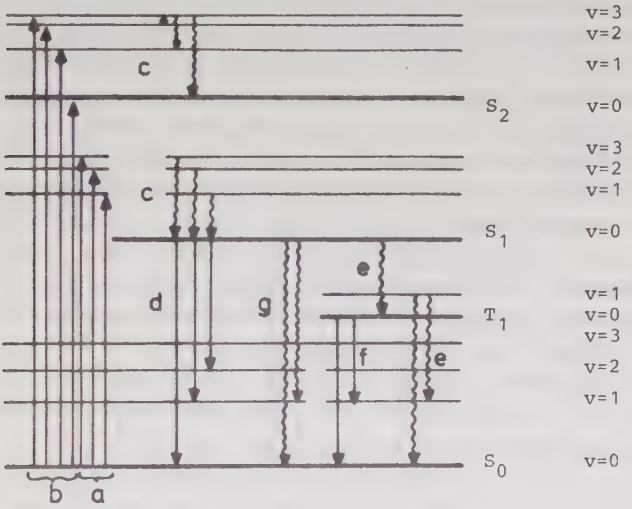


Abb.4: Vereinfacht dargestelltes JABLONSKI-Termschema der Fluoreszenz und ihrer Konkurrenzprozesse

S Singulett-
T Triplett - Elektronenzustände
Indices 0: Grundzustand
1: erster elektronisch angeregter Zustand
2: zweiter elektronisch angeregter Zustand usw.

v Schwingungsniveaus

a,b Absorption unterschiedlicher Energiequanten

c strahlungslose Desaktivierung, Energieabgabe im gleichen Elektronenzustand

d Emission von Strahlung, Lumineszenz:bei S_1-S_0 Fluoreszenz

e Umwandlung in den Triplettzustand, intersystem crossing

f Emission von Strahlung, Lumineszenz:bei T_1-S_0 Phosphoreszenz

g weitere strahlungslose Desaktivierung

gerade Pfeile: Übergänge mit Strahlungsabsorption oder -emission

Pfeile mit Wellenlinie: strahlungslose Übergänge

Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten Moleküle im untersten Schwingungsniveau des Grundzustandes S_0. Durch Energieabsorption können die Moleküle einen der energetisch höher angeregten S_1- oder S_2-Zustände erreichen, je nach Größe des Energiebetrages. Kürzere Wellenlängen sind energiereicher als längere und führen daher eher zur Anhebung auf S_2 und höher. Diese angeregten Zustände sind relativ instabil und kurzlebig. Der Energieüberschuß wird rasch durch Molekülstöße abgegeben, wodurch das Molekül auf das niedrigste, relativ stabile Schwingungsniveau des angeregten Zustandes zurückfällt (S_1, v=0). Zusätzlich erfolgen bei Molekülen, die einen höheren als den zweiten angeregten Zustand besetzen, interne Übergänge von den unteren Schwingungsniveaus eines höheren Anregungszustandes auf energiegleiche höhere Schwingungsniveaus eines niedrigeren Anregungszustandes. Als Fluoreszenz bezeichnet man den Übergang d vom untersten Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustandes auf eines der Schwingungsniveaus des Grundzustandes. Die Zeit der fluoreszenzauslösenden Übergänge liegt bei etwa 10^{-8}s, für strahlungslose Übergänge dagegen lediglich bei etwa 10^{-11}s. Da der Übergang c schneller erfolgt als die Übergänge der Gruppe d, so tritt, ganz gleich, ob mit kürzer- oder längerwelliger Strahlung angeregt wird, Fluoreszenzstrahlung derart auf, daß stets ein Übergang vom untersten S_1 Niveau nach S_0 abläuft.

Die Emissionsübergänge treten nicht unmittelbar von den durch die Anregung erreichten Schwingungsniveaus aus auf. Absorptions- und Fluoreszenzspektren haben daher nur die Bande des 0 - 0 -Überganges (Übergang vom untersten Schwingungsniveau des Grundzustandes zum untersten Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustandes) gemeinsam. Alle anderen Übergänge bei der Absorption benötigen mehr Energie als jeglicher Übergang bei der Fluoreszenzemission. Theoretisch müßten sich aus diesem Grunde Absorptions- und Emissionsspektren bei der dem 0 - 0-Übergang entsprechenden

Wellenlänge überlappen. In Wirklichkeit stimmen sie nur selten überein, bedingt durch Wechselwirkungen zwischen absorbierenden Molekülen und den sie umgebenden Lösungsmittelmolekülen: es ist zu berücksichtigen, daß experimentell die äußere Fluoreszenz gemessen wird[18]. Diese unterscheidet sich in der Spektralverteilung von dem ursprünglich emittierten Licht. In den Wellenlängenbereichen, in denen sich Absorptions- und Fluoreszenzstrahlung überschneiden, kommt es zu einer teilweisen Reabsorption des aus der Probe emittierten Lichtes. Diese Reabsorption, die von der Konzentration des absorbierenden Stoffes und der Schichtdicke abhängt, führt zu einer langwelligen Verschiebung der Fluoreszenzbande, ohne daß sich die eigentlichen Termdifferenzen der 0 - 0-Übergänge unterscheiden. Außerdem findet man, daß beim Übergang von unpolaren zu polaren Lösungsmitteln das Fluoreszenzmaximum viel stärker zur längerwelligen Seite verschoben wird als das Absorptionsmaximum[19]. n - π^*-Übergänge erfahren mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels eine "Blauverschiebung", $\pi - \pi^*$-Übergänge dagegen eine "Rotverschiebung"[20].

Bevor Strahlung emittiert werden kann, muß das Molekül zunächst Strahlung absorbieren.
Für die Lichtabsorption von Stoffen in Lösungen gilt das LAMBERT-BEERsche Gesetz (2)

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d = E \qquad (2)$$

I_0 = Intensität des eingestrahlten Lichtes
I = Intensität des austretenden Lichtes
ε = molarer Extinktionskoeffizient [l/mol·cm]
c = Konzentration der Probe im Lösungsmittel [mol/l]
d = Schichtdiche der Lösung [cm]

Für die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Intensität der Anregungsstrahlung gilt, daß die Intensität der nach allen Seiten gerichteten Fluoreszenzstrahlung gleich ist der Intensität des absorbierenden Lichtes multipliziert mit der Quantenausbeute der Fluoreszenz. Die Grundgleichung (3) lautet demnach[21,22]:

$$F = I_0 \cdot \Phi \, (1 - e^{-\varepsilon \cdot c \cdot d}) \qquad (3)$$

F = Fluoreszenzintensität
Φ = Fluoreszenzquantenausbeute

Außer der Konzentration sind für die Fluoreszenz maßgebend:

- die Quantenausbeute Φ , die jedoch selbst unabhängig ist von der Intensität des eingestrahlten Lichtes, da

$$\Phi = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}}$$

- die Intensität der Erregerstrahlung I_0 durch ein Verstärken der Lichtquelle ist meist eine Steigerung der Fluoreszenzintensität möglich; Einschränkungen dieser Abhängigkeit erfordern photochemische Zersetzungsprodukte der Moleküle
- des molaren Extinktionskoeffizienten ε der absorbierenden Verbindung.

Für verdünnte Lösungen reduziert sich die Grundgleichung (3) zu einer solchen vergleichbar mit dem LAMBERT-BEERschen Gesetz in der Spektrophotometrie (4):

$$F = 2{,}3^* \cdot \Phi \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d \qquad (4)$$

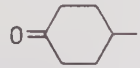
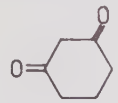
*2,3 = Faktor, der durch Umrechnung des Gesetzes auf den Logarithmus naturalis entsteht.

Das heißt, die Fluoreszenzintensität einer gegebenen lichtabsorbierenden Substanz ist bei konstanter Intensität und Frequenz der Erregerstrahlung für ein und dasselbe Gerät direkt proportional der Konzentration des fluoreszierenden Produktes.
Fluorimeter können geringe Substanzmengen mit hoher Sicherheit nachweisen. Da die Geometrie eines Spektrophotometers 180° beträgt, erhält der Empfänger ständig die sehr intensive Erregerstrahlung. Dies führt zu einem hohen elektrischen Signal. Es werden also geringe Differenzen zwischen großen Signalen gemessen (Probe - Referenzwert). In der Fluorimetrie registriert der Empfänger nur die Fluoreszenzstrahlung der Probe, da im 90° Winkel gemessen wird. Deshalb ist der Untergrund gleich Null. Die Genauigkeit der Messung ist immer vollkommen unabhängig von der Konzentration.
Die Spezifität der Fluoreszenz resultiert aus zwei Hauptgründen: es gibt weniger fluoreszierende Verbindungen als absorbierende, denn alle absorbierenden Stoffe müssen Strahlung absorbieren, aber nicht alle Verbindungen, die Strahlung absorbieren,emittieren auch. In der Fluorimetrie werden zwei Wellenlängen benötigt, in der Spektrophotometrie dagegen nur eine. Zwei Komponenten mit gleicher Absorptionswellenlänge strahlen höchst wahrscheinlich nicht bei derselben Wellenlänge. Die Differenzen zwischen Anregungs- und Emissionwellenlänge liegen zwischen 10 bis 280 nm.

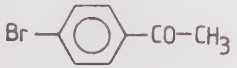
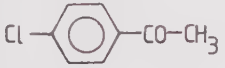
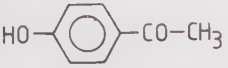
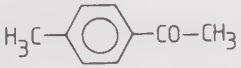
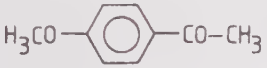
4. Die Umsetzung von NMN mit Substanzen, die aktive Methylengruppen enthalten

Da N-1-Methylnicotinamidchlorid (NMN) nach Darstellung der Japaner NAKAMURA und TAMURA[9] ein spezifisches Reagens auf aktive Methylengruppierungen sein soll, werden neue Verbindungen mit diesem Strukturelement gesucht, die sich mit NMN zu einem Fluoreszenzprodukt umsetzen und sich möglicherweise derart quantitativ erfassen lassen.
Die genannten Autoren entwickelten einen Screening-Test, mit dessen Hilfe das Ergebnis der Reaktion ohne großen apparativen und präparativen Aufwand rasch abgelesen werden kann: einige mg der zu untersuchenden Substanz, das Reagens und Lauge werden in einem Reagenzglas gut durchmischt und nach kurzer Zeit mit Säure angesäuert und erhitzt. Das Reagenzglas wird unter einer langwelligen (365 nm) UV-Lampe betrachtet.
Es stellt sich die Frage nach der Empfindlichkeit. Wendet man diesen Vortest auf einige bereits untersuchte Substanzen an, so findet man, daß Substanzen mit relativen Fluoreszenzintensitäten bis etwa 7% auf diese Weise noch gut unter einer langwelligen UV-Lampe erkannt werden können (relative Fluoreszenzintensität bedeutet - gemessen im Anregungsmaximum und bezogen auf willkürlich festgelegte 100% Intensität des Acetophenon-Reaktionsproduktes); d.h. relativ schwache Fluoreszenzen (bedingt durch schlechte Umsetzung und/oder ungeeignete Anregungswellenlänge) können mit dem bloßen Auge erfaßt werden. Stoffe, deren relative Fluoreszenzintensitäten unter 7% liegen, werden im Vortest kaum oder gar nicht nachgewiesen. Für sie ist eine fluorimetrische Bestimmung mit NMN in analytischen Konzentrationen nicht sinnvoll.
Der Fluoreszenz-Screening-Test wird mit 88 Substanzen aus verschiedenen Stoffklassen durchgeführt. Der aus der Literatur[23,24] bekannte Nachweis für aktive Methylengruppen mit 1,3-Dinitrobenzol und 0,5N ethanol.Kalilauge soll als Hinweis auf geeignete Substanzen dienen. In Tabelle 5a+b sind die Ergebnisse der beiden Nachweisverfahren zusammengefaßt.

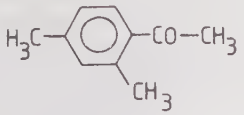
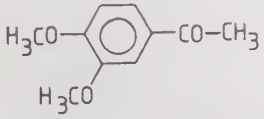
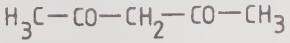
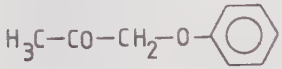
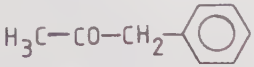
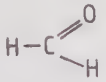
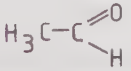
Tab.5a: Verhalten ausgewählter Substanzen beim Test auf aktive Methylengruppen mit 1,3-Dinitrobenzol/Kalilauge und im Fluoreszenz-Screening-Test

Nr.	Substanz	Formel	Test auf aktive Methylengruppen mit m-DNB/KOH	Fluoreszenz-Screening-Test
	Cyclohexanderivate			
9	4-tert.Butylcyclohexanon		sofort violett	+
10	4-Methylcyclohexanon		sofort violett	+
11	1,3-Cyclohexandion		farblos	±
12	1,4-Cyclohexandion		sofort violett	+

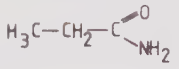
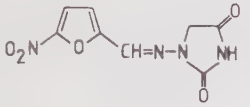
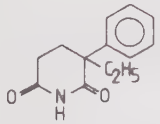
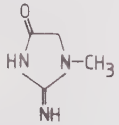
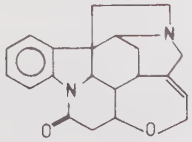
Fortsetzung Tab.5a

13	2-Cyclohexenon		sofort violett nach ca. 30 s entfärbt	+
	<u>Acetophenonderivate</u>			
14	p-Bromacetophenon		sofort violett	+
15	p-Chloracetophenon		sofort violett	+
16	p-Hydroxyacetophenon		farblos	-
17	p-Methylacetophenon		sofort violett	+
18	p-Methoxyacetophenon		sofort violett	+

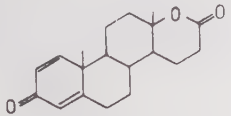
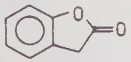
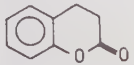
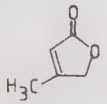
Fortsetzung Tab.5a

19	2,4-Dimethylacetophenon		sofort violett	±
20	3,4-Dimethoxyacetophenon		sofort rot-violett	-
	Acetonderivate			
21	Acetylaceton		farblos	±
22	Benzoylaceton		farblos	±
23	Phenylaceton		sofort violett nach gelb entfärbt	+
	Aldehyde			
24	Formaldehyd		farblos	-
25	Acetaldehyd		allmählich rot	-

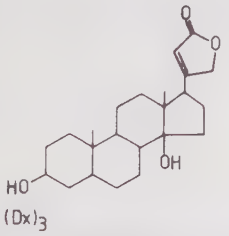
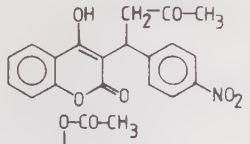
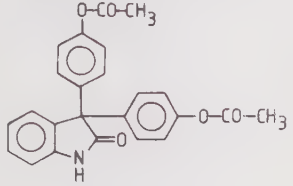
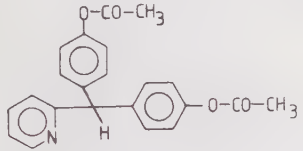
Fortsetzung Tab.5a

	Amide			
26	Propionamid		farblos	-
27	Nitrofurantoin		farblos	-
28	Glutethimid		allmählich violett	-
29	Kreatinin		sofort violett	-
30	Strychnin		farblos	-

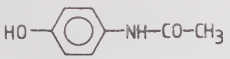
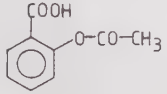
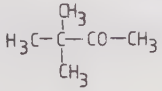
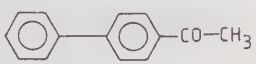
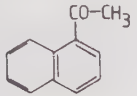
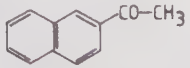
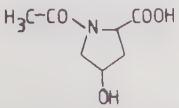
Fortsetzung Tab.5a

	$-CH_2-CO-O-$			
31	Testolacton		allmählich violett	-
32	Cumaranon		sofort tiefrot	+
33	Dihydrocoumarin		negativ	-
34	γ-Butyrolacton		negativ	-
	$-\overset{|}{C}=CH-CO-O-$			
35	ß-Methyl-$\Delta^{\alpha,\beta}$-butenolid		violett	$\pm$

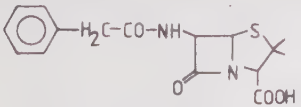
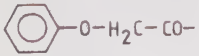
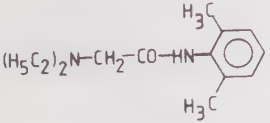
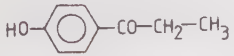
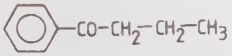
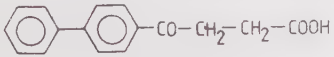
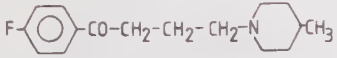
Fortsetzung Tab.5a

36	Digitoxin		violett	±
37	Digitoxigenin		violett	±
	$-CO-CH_3$			
38	Acenocoumarol		negativ	-
39	Oxyphenisatinacetat		negativ	-
40	Bisacodyl		negativ	-

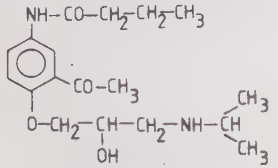
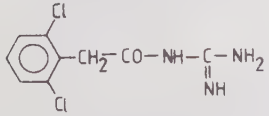
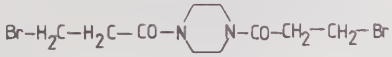
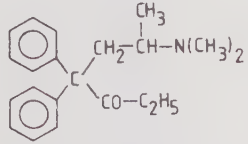
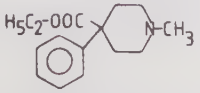
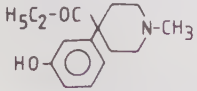
Fortsetzung Tab.5a

41	Paracetamol		negativ	-
42	Acetylsalicylsäure		negativ	-
43	Pinakolon		sofort violett	±
44	4-Acetylbiphenyl		sofort violett	+
45	1-Acetylnaphthalin		sofort violett bereits mit KOH rötlich gefärbt	-
46	2-Acetylnaphthalin		sofort violett	+ gelbe Fl. jedoch bereits mit Ameisensäure
47	Oxaceprol		negativ	-

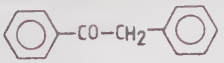
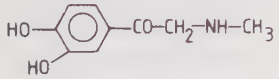
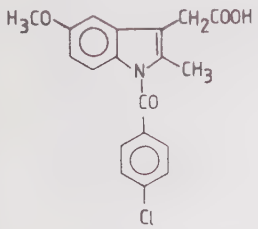
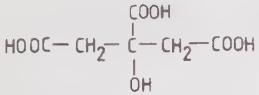
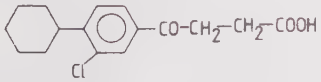
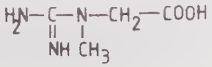
Fortsetzung Tab.5a

	$-CO-CH_2$ - offenkettig			
48a	Benzylpenicillin-G		negativ	-
48b	Benzylpenicillin-V		negativ	-
49	Lidocain		negativ	-
50	Paraoxypropiophenon		allmählich rot	-
51	Butyrophenon		sofort violett	±
52	Fenbufen		sofort violett	-
53	Melperon·HCl		sofort violett	-

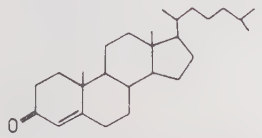
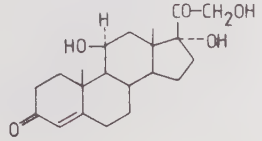
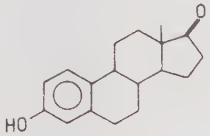
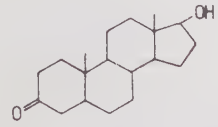
Fortsetzung Tab.5a

54	Acebutolol·HCl		allmählich rot	-
55	Guanfacin·HCl		negativ	-
56	Pipobroman		negativ	-
57	Methadon		allmählich rot	-
58	Pethidin		allmählich rot	-
59	Cetobemidon		negativ	-

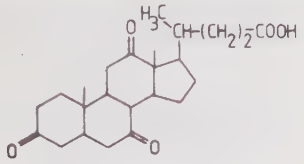
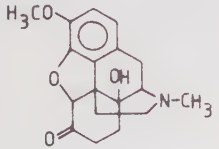
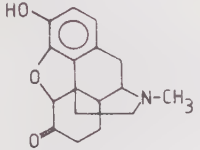
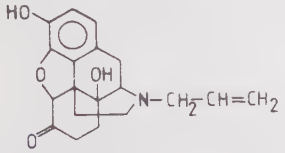
Fortsetzung Tab.5a

60	Desoxybenzoin		sofort violett	±
61	Adrenalon·HCl		negativ	-
62	Indometacin		negativ	-
63	Citronensäure		negativ	-
64	Acidum bucloxicum (Ca^{2+})		sofort violett	±
65	Kreatin		negativ	-

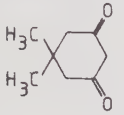
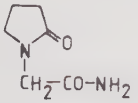
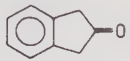
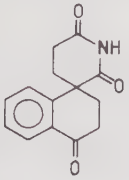
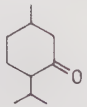
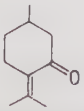
Fortsetzung Tab.5a

	$-CO-CH_2$ - cyclisch			
66	4-Cholestenon-3		sofort violett	±
67	Hydrocortison		allmählich violett	±
68	Östron		sofort violett	±
69	5- α-Dehydrocortison		sofort violett	-

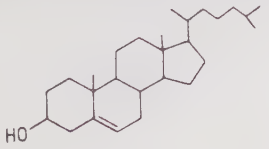
Fortsetzung Tab.5a

70	Dehydrocholsäure		sofort violett	++
71	Oxycodon		sofort violett	-
72	Hydromorphon		sofort violett	±
73	Naloxon		sofort violett	-

Fortsetzung Tab.5a

74	Dimedon		negativ	–
75	Piracetam		negativ	–
76	2-Indanon		leicht rötlich	±
77	Alonimid		sofort violett	++
78	Menthon		sofort violett	+
79	Pulegon		sofort violett	±

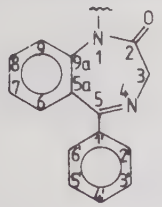
Fortsetzung Tab.5a

80	Cholesterin		farblos	-
	Benzodiazepine siehe Tab.5b			

++ sehr starke Fluoreszenz
+ Fluoreszenz
± äußerst geringe Fluoreszenz
- keine Fluoreszenz

Tab.5b: Verhalten ausgewählter Benzodiazepine beim Test auf aktive Methylengruppen mit 1,3-Dinitrobenzol/Kalilauge und im Fluoreszenz-Screening-Test

1,4-Benzodiazepinone

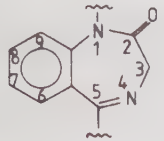


Nr.	N-1	N-4	C-7	C-2'	INN-Bezeichnung	Warenzeichen (Beispiele)	Färbung mit 1,3-Dinitrobenzol und 0,5N ethanol. KOH	Fluoreszenz-Screening-Test
81	H	-	NO_2	H	Nitrazepam	Mogadan^R	allmählich gelbbraun -	-
82	H	-	NO_2	Cl	Clonazepam	Rivotril^R	allmählich gelbbraun -	±
83	H	-	Cl	H	Desmethyl-diazepam	Madar^R	allmählich gelbbraun -	±
84	H	O	Cl	H	Demoxepam		farblos -	-
85	CH_3	-	Cl	H	Diazepam	Valium^R	sofort violett +	-
86	CH_3	-	NO_2	F	Flunitraz-epam	Rohypnol^R	sofort violett +	±
87	$(CH_2)_2$-N$(C_2H_5)_2$	-	Cl	F	Flurazepam	Dalmadorm^R	sofort violett +	±

Fortsetzung Tab.5b

88	CH_2-	-	Cl	H	Prazepam	Demetrin^R	sofort violett +	-
89	CH_2-C≡CH	-	Cl	H	Pinazepam	Domar^R	sofort violett +	±

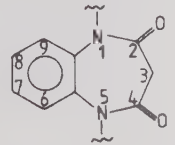
1,4-Benzodiazepinone



Nr.	N-1	C-5	C-7	INN-Bezeichnung	Warenzeichen (Beispiele)	Färbg.mit 1,3-Dinitrobenzol und 0,5N ethanol. KOH	Fluoreszenz-Screening-Test
90	CH_3	Cyclohexenyl	Cl	Tetrazepam	Musaril^R	sofort violett +	-
91	H	2-Pyridyl	Br	Bromazepam	Lexotanil^R	rot-violett +	-

Fortsetzung Tab.5b

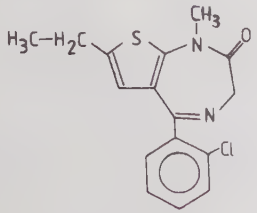
1,5-Benzodiazepinone



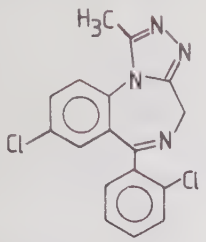
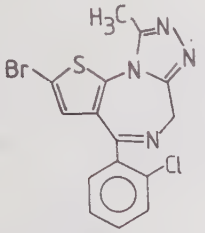
92	CH_3	Phenyl	CF_3	Triflubazam		allmählich rosa	-	-
93	CH_3	Phenyl	Cl	Clobazam	Frisium^R	allmählich rosa	-	-

Thieno-Derivat

94				Clotiazepam	Trecalmo^R	sofort violett	+	-



Fortsetzung Tab.5b

	Triazolo-Derivat				
95		Triazolam	Halcion^{R}	sofort blau-violett	allmählich grüne Fl.
96		Brotizolam		sofort blau-violett	allmählich grüne Fl.; gelbgrüne Fl. allein mit Ameisensäure

++ sehr starke Fluoreszenz

\+ Fluoreszenz

± äußerst geringe Fluoreszenz

\- keine Fluoreszenz

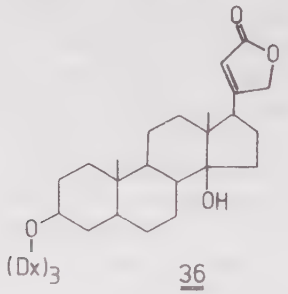
Überwiegend treten keine oder äußerst schwache Fluoreszenzen auf. Einige Derivate der bereits untersuchten Substanzen Aceton, Acetophenon und Cyclohexanon zeigen unter der UV-Lampe deutlich blaue Fluoreszenzen. Von den Arzneistoffen reagieren lediglich Alonimid und Dehydrocholsäure mit NMN. Die in die Klasse der Benzodiazepine gesetzte Erwartung - Umsetzung auch jener Stoffe mit NMN, die ein Meisenheimer- bzw. Zimmermannprodukt bilden - erfüllt sich nicht.

Mit 1,3-Dinitrobenzol und Lauge zeigen N-1-substituierte Benzodiazepine positive Reaktion (Violettfärbung), N-1-unsubstituierte Derivate reagieren mit Ausnahme von Bromazepam nicht[8]. In jedem Fall wird eine Carbonylgruppe oder eine andere elektronenziehende Komponente am C-2 benötigt, um die Methylengruppe ausreichend zu aktivieren. Voraussetzung für die Reaktion ist das Vorhandensein eines aciden Protons, welches mit der Lauge abgespalten werden kann und dadurch ein Carbanion gebildet wird. Da für den Reaktionsmechanismus zur Bildung des Fluoreszenzproduktes gleiche Voraussetzungen gelten, wird angenommen, daß sich ebenfalls die N-1-substituierten Benzodiazepine mit NMN umsetzen. Dies trifft nicht zu. 1,4- und 1,5-Benzodiazepinone, die eine Violettfärbung mit 1,3-Dinitrobenzol und Lauge zeigen, ergeben im Fluoreszenz-Screening-Test eine sehr schwache oder gar keine Reaktion. Nur die Verbindungen 86, 87, 89 zeigen unter der UV-Lampe bei 365 nm Anregungswellenlänge eine geringe bläuliche Fluoreszenz, deren Intensität sich jedoch kaum vom Referenzwert unterscheidet (Referenzlösung enthält alle Reagenzien außer der jeweiligen Carbonylkomponente). Neuere Produkte aus der Reihe der Triazolo-Derivate wie Triazolam und Brotizolam, die nur eine aktive Methylengruppe ohne Carbonylfunktion in Nachbarstellung besitzen, bilden ebenfalls kein Fluoreszenzprodukt. Brotizolam gibt bereits mit Ameisensäure eine gelb-grüne Fluoreszenz ohne Zugabe von NMN. Da die Empfindlichkeit dieses Testes zuvor abgeschätzt wurde, darf eine weitergehende Messung der

Benzodiazepine als nicht erfolgversprechend angesehen werden.

Alle Stoffe, die im Screening-Test eine einigermaßen positive Reaktion gezeigt haben, werden nach der Methode von NAKAMURA und TAMURA umgesetzt und fluorimetrisch vermessen. Besonderes Interesse gilt hierbei dem pharmazeutisch relevanten Herzglykosid Digitoxin.

Wichtig für den Ablauf der Reaktion ist nach Darstellung der japanischen Arbeitsgruppe das Vorhandensein der Gruppierung $R\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}R'$. Es stellt sich die Frage, ob nicht auch eine Verbindung mit vinyloger aktiver Methylengruppe die Bildung eines Fluoreszenzproduktes eingehen kann. Dieses Strukturelement $R\text{-}CO\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}R'$ ist im Lactonring des Digitoxins (36) enthalten.



36

Bisherige Nachweise[25-28] basieren in erster Linie auf chromatographischer Trennung mit anschließender Detektion durch Trichloressigsäure/Chloramin T und Trocknen bei 120°. Von einer fluorimetrischen Bestimmung wird eine spezifische und zugleich einfacher durchzuführende Nachweismethode erhofft.

Zunächst wird die beschriebene Reaktion mit Acetophenon, dessen Fluoreszenzprodukt von den bereits untersuchten Substanzen die höchste Fluoreszenzintensität ergab, nachvollzogen. Zur Messung dient das Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss mit einer Quecksilberlampe.

N-1-Methylnicotinamidiodid, anstelle von N-1-Methylnicotinamidchlorid eingesetzt, soll nach GIRKIS-TAKLA und CHRONEOS[29] keine anderen Ergebnisse liefern. Es stellt sich jedoch heraus, daß die Reaktionslösung photolabil ist und sich während der fluorimetrischen Messung gelb färbt; die Fluoreszenzstrahlung nimmt dabei rasch ab. Aus diesem Grund wird für die folgenden Messungen N-1-Methylnicotinamidchlorid als Reagens beibehalten.

Die Lösung der Carbonylkomponente soll möglichst aus destilliertem Wasser hergestellt werden, ansonsten mit Ethanol. Da Digitoxin wasserunlöslich ist, müssen ethanolische Lösungen eingesetzt werden. Die Referenzlösung - bestehend aus Ethanol, NMN, Natronlauge und Ameisensäure ohne Digitoxin - zeigt bereits eine relativ hohe Fluoreszenzintensität im Gegensatz zu einer wäßrigen Referenzlösung (Wasser, NMN, Natronlauge und Ameisensäure). Die Digitoxinreaktionslösung besitzt jedoch im Vergleich zu einer Acetophenonreaktionslösung gleicher molarer Konzentration nur äußerst geringe Fluoreszenzintensität; dies macht eine maximale Verstärkung am Gerät erforderlich. Die Werte auch der Referenzlösung liegen schon deshalb entsprechend höher. Eine sinnvolle Messung ist unter diesen Bedingungen in Frage gestellt. Bei der Subtraktion der Referenzwerte von den Probenwerten erhält man zum Teil negative Zahlen. Aus den ersten Messungen ergibt sich eine Mindestkonzentration der Carbonylkomponente Digitoxin in der Reaktionslösung von $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ molar (100µl 10^{-5} molarer Lösung auf 1800µl Gesamtvolumen).

Für die Aufnahme eines Anregungsspektrums ist ein anderer Geräteaufbau erforderlich. Da dieser zunächst nicht in der gewünschten Form zur Verfügung stand, traten weitere Schwierigkeiten auf. Ein Hauptproblem stellt die Messung an der Grenze der Leistungsfähigkeit des Spektrometers bedingt durch die maximale Verstärkung dar.

Dennoch wird auf eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Digitoxinkonzentration aufgrund der gefundenen Daten im Bereich zwischen $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ und $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ molarer Reaktionslösung geprüft, die bestätigt werden kann.

Bei der Wiederholung der Meßreihen treten erneut Schwankungen in den Intensitäten auf, die zuvor auf apparative Mängel zurückgeführt worden waren. Um zufällige Abweichungen auszuschließen, wird eine Versuchsreihe durchgeführt. Ihre Auswertung führt zu keiner Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Trotz systematischer Suche nach den möglichen Fehlerquellen kann keine eindeutige Erklärung für das Auftreten der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten bei anscheinend gleichen Bedingungen gegeben werden. Digitoxin läßt sich weder mit NMN zuverlässig zu einem Fluoreszenzprodukt umsetzen und so nachweisen noch quantitativ bestimmen (siehe Anhang).

Für weitere mit dem Screening-Test ausgesuchte Substanzen sind in Tabelle 6 die jeweils optimale Anregungs- und Emissionswellenlänge und die relative Fluoreszenzintensität angegeben. Die eingesetzte Konzentration der ausgewählten Carbonylkomponenten beträgt 10^{-4} molar mit Ausnahme von 4-Cholestenon-3 (10^{-3} molar), was eine Konzentration in der Reaktionslösung von $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ bzw. $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molar ergibt. Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgt unter gleichen Bedingungen (konstanter Spalt und konstante Verstärkung) bei zuvor experimentell festgestellter Anregungswellenlänge der jeweiligen Substanz. Ebenso werden die Werte der Referenzlösungen mit reinem Ethanol bzw. Ethanol/Wasser-Gemisch (entsprechend der Verdünnung in der Reaktionslösung) ermittelt. Die in der Tabelle angegebenen relativen Fluoreszenzintensitäten sind zur Verdeutlichung nicht um den Betrag des Referenzwertes erniedrigt.

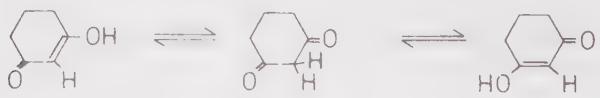
Tab.6: Fluoreszenzausbeuten verschiedener Carbonylkomponenten, gemessen unter identischen Geräteparametern bei jeweils optimaler Anregungs- und Emissionswellenlänge ($c = 5{,}6 \cdot 10^{-6}$ mol/l Reaktionslösung)

	Carbonylkomponente	opt.Anr.-wellenlänge (nm)	opt.Emiss.-wellenlänge (nm)	rel.Fl.-intensität [S.E.]
	Ethanol-Referenz	375	450	5,0
66	4-Cholestenon-3 ($c=5{,}6\cdot10^{-5}$mol/l Reaktionslösung)	375	452	4,9
68	Östron	375	452	5,1
36	Digitoxin	365	450	5,0
44	4-Acetylbiphenyl	395	467	>10
	Ethanol/Wasser-Referenz	378	435	4,5
11	1,3-Cyclohexandion	378	435	4,7
21	Acetylaceton	378	435	4,5
32	Cumaranon	380 (342)	440 (415)	3,8
43	Pinakolon	378	435	3,3
67	Hydrocortison	378	435	3,8
13	2-Cyclohexenon	368	458	>10
9	4-tert.Butylcyclohexanon	368	460	>10
10	4-Methylcyclohexanon	368	455	>10
12	1,4-Cyclohexandion	365	450	>10
14	p-Bromacetophenon	380	435	>10
15	p-Chloracetophenon	378	432	>10
16	p-Hydroxyacetophenon	378	435	8,5
18	p-Methoxyacetophenon	396	463	>10
19	2,4-Dimethylacetophenon	378	435	>10

Fortsetzung Tab.6

22	Benzoylaceton	378	435	8,1
23	Phenylaceton	367	470	> 10
51	Butyrophenon	375	450	> 10
70	Dehydrocholsäure	360	445	> 10
77	Alonimid	410	460	> 10

Es läßt sich sofort erkennen, daß Reaktionslösungen solcher Verbindungen, die im Vortest eine schwache Fluoreszenz gezeigt haben, breite Maxima im Bereich derselben Wellenlänge wie die des Referenzwertes besitzen. Die relative Fluoreszenzintensität liegt ebenfalls nicht merklich oberhalb des Referenzwertes. Eine zusätzliche, von der zu untersuchenden Komponente herrührende Fluoreszenz ist nicht entstanden.
Es handelt sich bei den aufgenommenen Spektren lediglich um Referenzspektren. Der Einsatz von höheren Konzentrationen scheitert an der schlechten Löslichkeit dieser Verbindungen im benötigten Lösungsmittel Wasser oder Ethanol; zudem ist eine Steigerung der Konzentration über analytisch nachzuweisende Mengen hinaus im Hinblick auf eine empfindliche Methode nicht angebracht.
Die Cyclohexanderivate geben eine blaue Fluoreszenz bei einem Anregungsmaximum von etwa 378 - 38o nm und einem Emissionsmaximum von 432 - 435 nm. 1,3-Cyclohexandion bildet im Gegensatz zu 1,4-Cyclohexandion kein Fluoreszenzprodukt, da durch die Keto-Enol-Tautomerie keine $CO-CH_2$-Gruppierung mehr vorliegt.



11

Die Acetonderivate zeigen gleiche Maxima wie Acetophenon (378/432 nm). Bei p-Methoxyacetophenon kommt es durch Einführung der Methoxygruppe zu einer Erniedrigung der Anregungsenergie. Die Maxima sind nach längeren Wellenlängen verschoben. p-Hydroxyacetophenon, bei welchem der Vortest negativ verlief, bildet in sehr geringer Ausbeute ein Fluoreszenzprodukt, dessen relative Intensität nur um 4 Einheiten (Kästen Schreiberpapier) höher liegt als der Referenzwert.

Für Reaktionslösungen mit starker Fluoreszenzstrahlung kann die gewählte Geräteeinstellung nicht beibehalten werden. Die Spektren sind in diesem Fall lediglich qualitativ ausgewertet. Das entstandene Fluoreszenzprodukt aus Dehydrocholsäure und NMN zeigt bei 360 - 365 nm ein Anregungs- und bei 445 - 450 nm ein Emissionsmaximum, welches deutlich über dem Referenzwert liegt. Für Alonimid werden zwei Maxima im Anregungsspektrum beobachtet; eines um 360 - 365 nm und ein zweites bei 408 - 410 nm. Ihr Intensitätsverhältnis ist abhängig von der Konzentration des Alonimids in der Reaktionslösung. Mit zunehmender Konzentration an Alonimid steigt auch das Maximum bei 410 nm an, während sich dasjenige um 365 nm kaum verändert. Das Emissionsspektrum, gemessen bei 365 nm Anregung, ist identisch mit dem Referenzspektrum und hat bei etwa 445 nm seinen höchsten Wert. Für das Alonimidfluoreszenzprodukt erhält man die optimale Emissionswellenlänge um 408 - 410 nm. Das Choleretikum Dehydrocholsäure und das Sedativum Alonimid sollen bzgl. ihrer Reaktion mit NMN und Bildung eines Fluoreszenzproduktes für qualitative und quantitative Bestimmungen näher untersucht werden.

5. Untersuchungen zur fluorimetrischen Bestimmung mit NMN

5.1 Dehydrocholsäure

5.1.1 Allgemeines zur Dehydrocholsäure

Die Dehydrocholsäure - als nicht natürlich vorkommende Gallensäure[30] - gehört neben den natürlichen, konjugierten, nicht oxidierten Gallensäuren zur Stoffklasse der Choleretika. Choleretika erhöhen die Gallenproduktion in der Leber. Sie rufen nach der Resorption aus dem Dünndarm als gallenpflichtige Substanzen die Sekretion verdünnter Gallenflüssigkeit hervor[31]. Die Dehydrocholsäure wird durch Oxidation aus der in der Rindergalle vorkommenden Cholsäure gewonnen. Sie besitzt eine Vielzahl pharmakologischer Eigenschaften. Neben der erhöhten Galleproduktion der Leberzellen bewirkt sie zudem einen vermehrten Galleabfluß (cholekinetische Wirkung) in den Zwölffingerdarm. Die Durchblutung der Leberarterien wird verstärkt und die oxidativen Vorgänge dieses zentralen Stoffwechselorgans aktiviert. Unter Dehydrocholsäureeinfluß nimmt die Stärke der Herzkontraktionen bei nur geringgradig veränderter Frequenz erheblich zu und verbessert gleichfalls die Koronardurchblutung. Aufgrund seiner fettemulgierenden Eigenschaften begünstigt die Dehydrocholsäure die Aufspaltung der Nahrungsfette durch körpereigene Darmfermente (Lipasen). Dadurch werden zusätzlich optimale Wirkungsbedingungen für die übrigen Verdauungsfermente geschaffen. Es kommt deshalb zu einer verbesserten Verdauung sowohl der Fette als auch der Eiweiße und Kohlenhydrate. Aus einem leicht anregenden Effekt auf die Darmperistaltik resultieren die mild laxierenden Eigenschaften. Die Dehydrocholsäure als Natriumsalz ist die einzige Gallensäure, die parenteral angewandt werden kann.

Die Indikationen sind entsprechend breit gefächert. Sie führen über Anwendung bei Gallenwegserkrankungen ohne Leberbeteiligung wie chronischer Gallengangsentzündungen, Gallengangsdyskinesien, chronische Gallenblasenentzündungen ohne

Steinbefund über Allergien, Cholelithiasis, Depressionen, verminderter Diurese, Fettembolie, Gefäßerkrankungen, Rheumatoider Arthritis, Schockzuständen bis zu trophisch-leprösen Ulzerationen[32,33].

Die Monographie der Dehydrocholsäure ist im Deutschen Arzneimittel Codex DAC 1979, 1.Erg. 1981 und in der N.F. USP XX aufgenommen. Der DAC läßt die Dehydrocholsäure u.a.[34] mit Formaldehyd/Schwefelsäure im ultravioletten Licht bei 365 nm durch eine blaugrüne Fluoreszenz nachweisen bzw. auf Zusatz von m-Dinitrobenzol in verd. Natriumhydroxidlösung durch eine rotviolette Färbung innerhalb einer Minute.

5.1.2 Quantitative fluorimetrische Bestimmung der Dehydrocholsäure

Linearität

Wie bereits erwähnt, zeigt eine Reaktionslösung nach Umsetzen von Dehydrocholsäure mit NMN ein Anregungsmaximum bei 360 nm (Abb.5) und ein Emissionsmaximum bei 445 nm (Abb.6).

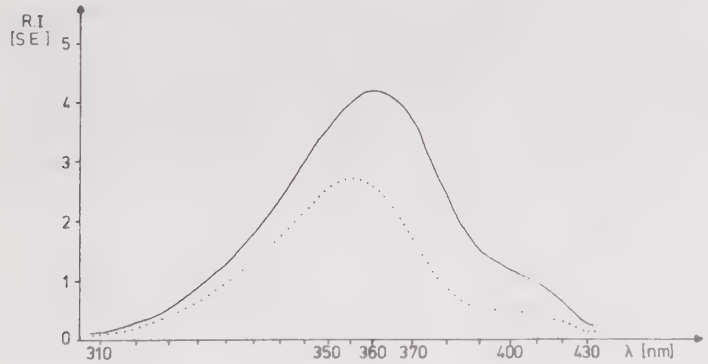


Abb.5: Anregungsspektrum einer Dehydrocholsäurereaktionslösung (———), Referenzlösung (••••)

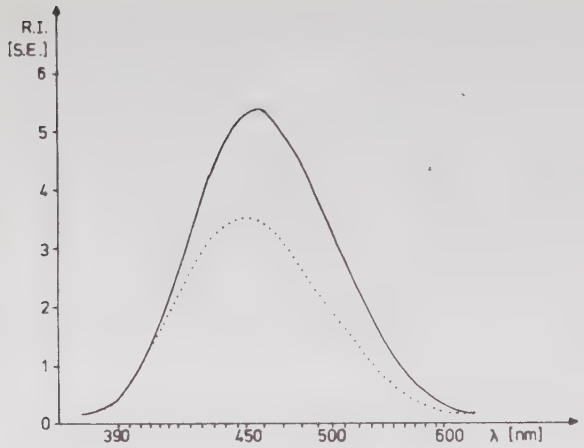


Abb.6: Emissionsspektrum einer Dehydrocholsäurereaktionslösung (———), Referenzlösung (····)

Es soll die Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration untersucht werden.
Da für sehr verdünnte Lösungen eine dem LAMBERT-BEERschen Gesetz entsprechende Beziehung gegeben ist, herrscht Linearität von niedriger Konzentration bis zu einer Maximalkonzentration. Nach deren Überschreiten wird die Löschung, d.h. die Reabsorption des emittierten Fluoreszenzlichtes in der Probe, so groß, daß die gemessene Fluoreszenzintensität wieder abnimmt (inner-cell effect). Allgemein kann man sagen, Linearität ist solange gegeben, wie die Probe weniger als 5% der Erregerstrahlung absorbiert.
Die Dehydrocholsäure wird zu 10^{-2} molar in Ethanol gelöst und drei mal schrittweise 1:10 auf 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} molar verdünnt. Je 100µl werden mit NMN zur Reaktion gebracht. Die Reaktionslösung ist $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ bis $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ molar; das entspricht einem Gehalt an Dehydrocholsäure von 223,6µg/ml bis 0,224µg/ml (Abb.7).

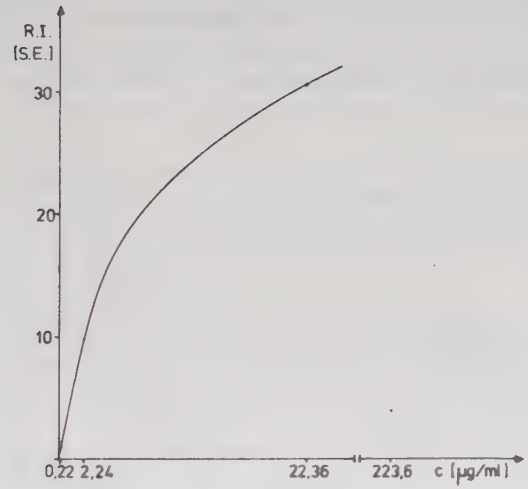


Abb.7: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Dehydrocholsäurekonzentration

Die Fluoreszenzintensität zeigt über den gewählten Gesamtbereich keine Linearität. Die Kurve verläuft zunächst linear und geht dann in eine Exponentialfunktion über. Erwartungsgemäß kann die Fluoreszenzintensität nur bis zu einem Maximalwert ansteigen, nach dessen Erreichen eine Erhöhung der Konzentration keine Zunahme der Intensität mehr bewirkt. Für die konzentrierteste Reaktionslösung ($5{,}6 \cdot 10^{-4}$ molar) fällt die Fluoreszenz stark ab, da die geforderte Bedingung gleichmäßiger Fluoreszenzstrahlung innerhalb der Küvette nicht erfüllt ist. Die Strahlung ist an der Oberfläche sehr viel stärker und nimmt mit zunehmender Schichtdicke aufgrund der Eigenabsorption wieder ab.

Die geforderte Proportionalität ist dagegen im Bereich von 0,2 bis 2,5µg/ml sehr gut erfüllt. Die Geradengleichung lautet y= 0,055 + 1,26x und besitzt den Korrelationskoeffizienten r= 0,9992. Dies verdeutlicht die gute Linearität zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration der Dehydrocholsäure in diesem Bereich.

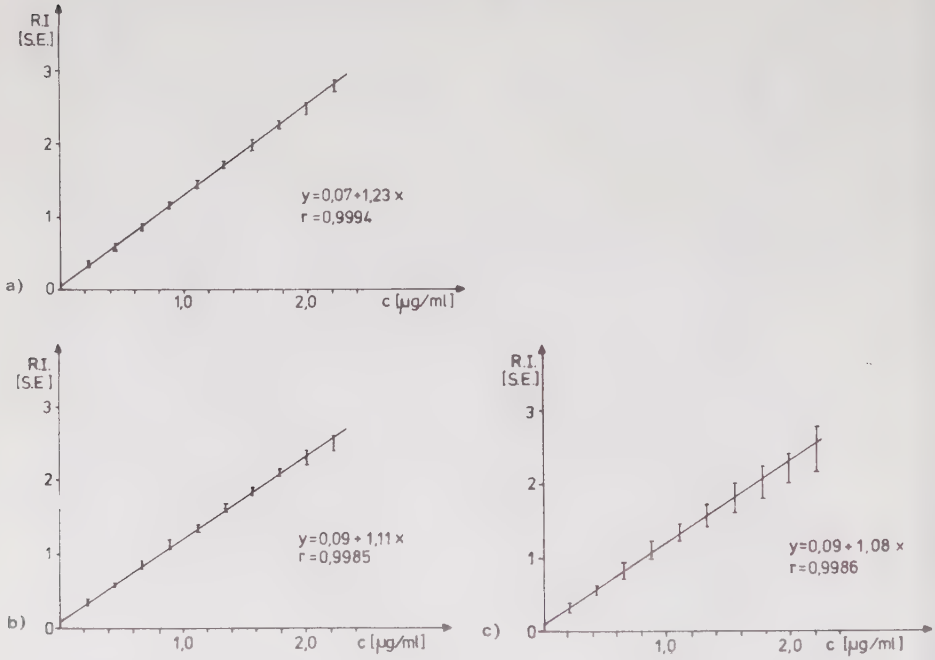


Abb.8: Regressionsgeraden für die Dehydrocholsäurefluoreszenzreaktion

a) aus wiederholten Messungen derselben Dehydrocholsäurekonzentrationsreihe

b) aus Messungen verschiedener Dehydrocholsäurekonzentrationsreihen am selben Tag

c) aus Messungen verschiedener Dehydrocholsäurekonzentrationsreihen an verschiedenen Tagen

Wiederholte Messungen derselben Dehydrocholsäurekonzentrationsreihe führen zu gut reproduzierbaren Ergebnissen (Abb.8a). Die Variationskoeffizienten der einzelnen Meßwerte (n= 3) schwanken zwischen 7,6 und 2,3%; bei stärkster Verdünnung - 0,2µg/ml - erhält man einen Variationskoeffizienten von 7,6%, für 1,1µg/ml 3,4% und für 2,2µg/ml 2,7%.
Für Messungen zehn verschiedener Dehydrocholsäurekonzentrationsreihen am selben Tag bestätigen sich die obigen Angaben (Abb.8b). Der Variationskoeffizient (n= 10) für 0,2µg/ml liegt bei 9,5%, für 1,1µg/ml bei 3,0% und für 2,2µg/ml bei 2,5%.
An sechs verschiedenen Tagen gemessene Versuchsreihen zeigen dagegen deutliche Streuungen der Signalintensitäten gleicher Konzentrationen, jedoch gleichbleibende Linearität: VK für 0,2µg/ml 20,4%, für 1,1µg/ml 9,6% und für 2,2µg/ml 12,3% (Abb.8c).
Es ist daher unerläßlich, bei quantitativen Bestimmungen vor jeder Meßreihe eine Eichgerade zu erstellen.
Werden die Reaktionslösungen im Kühlschrank bei etwa 8° aufbewahrt, bleiben sie über längere Zeit (24 h) stabil.
Erneute Messung nach 24 h ergibt keinen Intensitätsverlust.

Nachweisgrenze[35)]

Für den Begriff Nachweisgrenze existieren in der Literatur[35-37)] eine Vielzahl verschiedener Berechnungsmöglichkeiten. Übereinstimmend stellt er ein Maß für den kleinsten zuverläßig nachweisbaren Gehalt dar. Die Forderung des sicheren Nachweises eines Stoffes beinhaltet, daß die Differenz zwischen einer analytischen Meßgröße x und dem mittleren Blindwert $\bar{x}_{Bl}$ (Referenzwert) größer ist als ein bestimmtes Vielfaches m der Standardabweichung s des Blindwertes.

$$\underline{x} = \bar{x}_{Bl} + m\, s_{x_{Bl}}$$

Für m = 6 und $\bar{x}_{Bl}$ = 0,1733 (n= 15) und s = 0,02582 berechnet sich die Nachweisgrenze zu $\underline{x}$ = 0,33.

Die zugehörige Konzentration wird der Eichfunktion entnommen und liegt bei 50 ng/ml Reaktionslösung. Das entspricht 90 ng oder $2{,}2 \cdot 10^{-10}$ mol Dehydrocholsäure in 1800µl Reaktionslösung ($1{,}24 \cdot 10^{-7}$ mol/l).

Fehlerdiskussion

Die beschriebene Methode beinhaltet eine Fülle an Parametern, die die Intensität des Fluoreszenzproduktes beeinflußt. Die für die Probenvorbereitung verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel sollten unbedingt fluoreszenzfrei sein. Der Referenzwert einer Fluoreszenzmessung, der durch Eigenfluoreszenz der Küvette, Lösungsmittel und Reagenzien entsteht, muß möglichst klein gehalten werden; zumindest während einer Meßreihe wird Konstanz vorausgesetzt. Für Ethanol als Lösungsmittel der Ketokomponente liegt der Referenzwert dreimal höher als für Wasser. Das NMN-Reagens ist etwa vier Wochen im Kühlschrank haltbar; danach zeigt die Fluoreszenzintensität eine starke Abnahme. Weitere Fehler können durch Löschprozesse in der Lösung hervorgerufen werden. Neben Dosierungs- und Pipettierungenauigkeiten sind ebenfalls pH-Wert, Temperatur und Zeitdauer der einzelnen Reaktionsschritte maßgebend. Unterschiedliche Reaktionsbedingungen können ausgemittelt werden, wenn in jeder Meßreihe eine Eichlösung mitbestimmt wird. Abweichungen der gemessenen Fluoreszenz rühren schließlich von instrumentellen Änderungen her: Schwankungen der Lampenintensität, der Multiplier-Spannung, der Verstärkung, der Meßgeometrie.

5.1.3 UV-Bestimmung

Die Dehydrocholsäure ist für UV-spektroskopische Untersuchungen relativ ungeeignet. Aufgrund eines fehlenden konjugierten Systems besitzt sie in Ethanol bei 290 nm ein Absorptionsmaximum mit einem ε-Wert von nur etwa 80, ihr Natrium-Salz in Wasser bei 285 nm einen ε-Wert von 100.

Im Bereich von 0,6 bis 4 mg/ml gilt das LAMBERT-BEERsche Gesetz. Die Geradengleichung für Dehydrocholsäure-Natrium in Wasser aus den Mittelwerten von zehn Messungen in Serie lautet y= 0,25 x. Der Korrelationskoeffizient beträgt r= 1,0000 (Abb.9). Es ergibt sich ein Variationskoeffizient (n= 10) für 0,7 mg/ml von 3,6%, für 2,0 mg/ml von 1,5% und für 4,0 mg/ml von 1,1%.

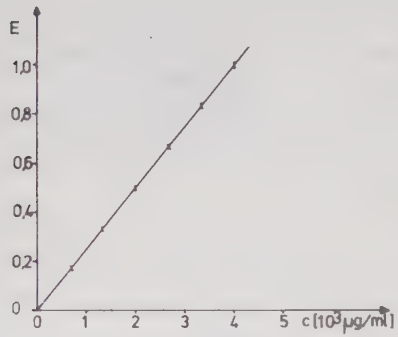


Abb.9: UV-Eichgerade für Dehydrocholsäure-Natrium in Wasser bei 285 nm.

5.1.4 Vergleich der fluorimetrischen Methode mit der UV-Bestimmung

Für UV-Messungen liegt die eingesetzte Konzentration an Dehydrocholsäure (DHS) im mg-, bei der fluorimetrischen Bestimmung dagegen im µg-Bereich (Tab.7). Die Variationskoeffizienten sind bei der UV-Methode besser - z.B. für eine mittlere Konzentration von 2,0 mg/ml 1,5% gegenüber 3% für 1,1µg/ml bei der Fluoreszenzmethode. Die Empfindlichkeit der fluorimetrischen Bestimmung ist jedoch zehnmal

höher. Mit der UV-Bestimmung lassen sich bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 2 : 1 noch $2,3 \cdot 10^{-5}$ mol/l, mit der Fluoreszenzmethode dagegen noch 10^{-7} mol/l DHS nachweisen. Letztere ist demnach um den Faktor 100 überlegen.

Tab.7: Gegenüberstellung der UV-Bestimmung und der Fluoreszenzmethode für DHS

	UV-Methode	Fluorimetrische Methode (bezogen auf die Reaktionslösung)
Konzentrationsbereich	0,6 - 4 mg/ml	0,2 - 2,5µg/ml
r	1,0000	0,9992
Variationskoeffizienten (n= 10)	für 0,7 mg/ml: 3,6% für 2,0 mg/ml: 1,5% für 4,0 mg/ml: 1,1%	für 0,2µg/ml: 9,5% für 1,1µg/ml: 3,0% für 2,2µg/ml: 2,5%
Empfindlichkeit (Steigung der Regressionsgeraden)	0,25 (DHS-Na/ Wasser)	1,26
reziproke Empfindlichkeit[38]	für E= 0,0044: 15,5µg/ml 1% Absorption	-
Nachweisgrenze	für ein Signal/ Rausch-Verhältnis 2 : 1 $2,3 \cdot 10^{-5}$ mol/l (≙ 9,8µg/ml)	$1,2 \cdot 10^{-7}$ mol/l[35] (≙ 50 ng/ml)

5.1.5 Bestimmung des Dehydrocholsäuregehaltes in Tabletten

UV-Methode

Es wird der Gehalt an Dehydrocholsäure in DECHOLIN^{R}-Tabletten, einem Monopräparat, bestimmt. Eine Tablette enthält laut Deklaration 250 mg DHS. Diese wird am vorteilhaftesten durch Zerfall der Tablette in Natronlauge extrahiert. Zunächst ist es wichtig, etwaige Dosierungsabweichungen und somit den tatsächlichen Gehalt festzustellen. Deshalb werden von fünf DECHOLIN^{R}-Tabletten in je 100 ml 0,1 N-NaOH ein UV-Spektrum aufgenommen. Die Kurve (Abb.10a) zeigt im Vergleich zur Reinsubstanz (Abb.10b) eine Schulter im Anstieg bei 325 nm durch Überlagerung mindestens einer weiteren absorbierenden Verbindung.

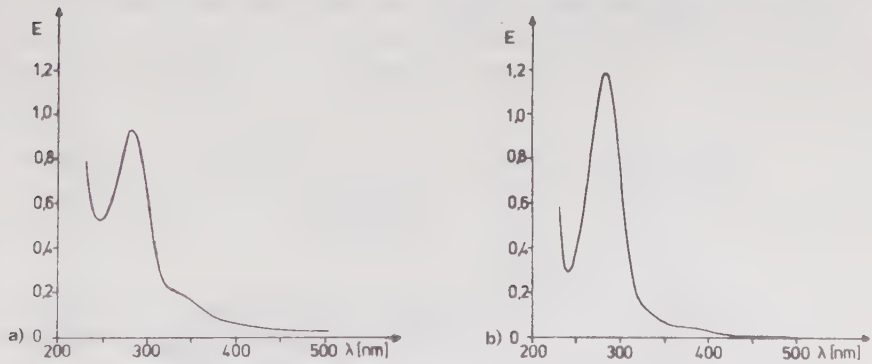


Abb.10: Elektronenspektren von DECHOLIN^{R} (a) und Dehydrocholsäure (b) in 0,1 N-NaOH gegen 0,1 N-NaOH.

Eine direkte quantitative Auswertung der Spektren im Maximum würde einen zu hohen Gehalt vortäuschen. Durch Anwendung der Derivativ-Spektroskopie[39,40] kann in diesem Fall der Fehler weitgehenst ausgeschaltet werden.
Unter Derivativ- (Ableitungs-)spektren versteht man die graphische Darstellung des Differentialquotienten

$$\frac{dE}{d\lambda}$$ für die 1.Ableitung

über einen bestimmten Wellenlängenbereich.

Die 1.Ableitung eines Spektrums kann auch als die graphische Darstellung der Steigung der Absorptionskurve für jeden beliebigen Punkt definiert werden. Charakteristisch sind die häufig auftretenden Maxima und Minima im Derivativspektrum. Die Wendepunkte im Originalspektrum führen in der 1.Ableitung zu einem Maximum bzw. Minimum, aus dem Absorptionsmaximum wird ein sogenannter Nulldurchgang. Die Wellenlängenposition und das Verhältnis der Extremwerte (Maxima, Minima) zueinander sind für ein absorbierendes Material charakteristische Größen.
Die quantitative Auswertung eines Derivativspektrums wird meist durch sogenannte Peak-zu-Peak-Vermessung vorgenommen. Zeigt ein Ableitungsspektrum mehrere Extremwerte, so wählt man zwei möglichst benachbarte Maxima und Minima mit großem Abstand in der Ordinatenrichtung. Die Höhen sind der Konzentration linear proportional (Abb.11).

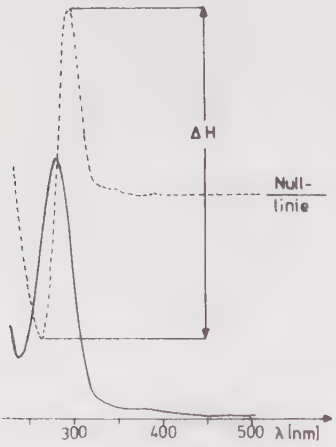


Abb.11: Elektronenspektren von Dehydrocholsäure in 0,1 N-NaOH gegen 0,1 N-NaOH
Grundspektrum (———), 1.Ableitung (- - -) $d^1A = 30$

Die Bestimmung der Dehydrocholsäure im Tablettengemisch erfolgt anhand der nach 1.Ableitung des UV-Spektrums aufgestellten Eichgeraden (Abb.12).

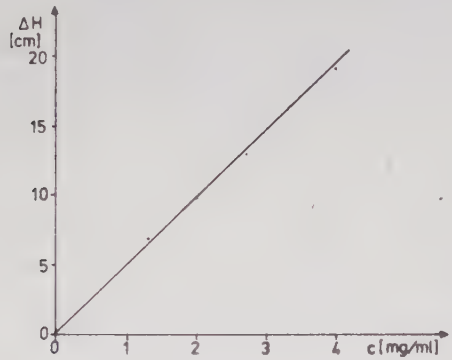


Abb.12: Eichgerade der Dehydrocholsäure in 0,1 N-NaOH nach Derivativ-Spektroskopie (1.Ableitung)

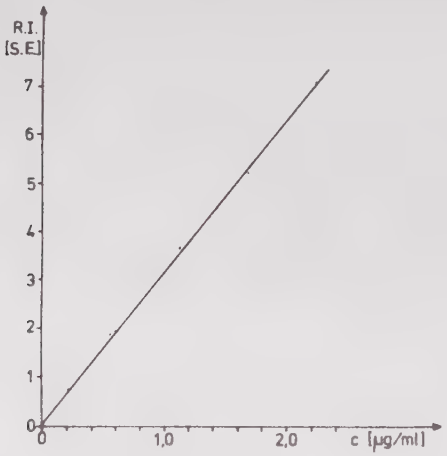
Die fünf DECHOLIN^{R}-Tabletten (Tab.8) zeigen eine durchschnittliche Überdosierung von 1,8% (s= 1,61, VK= 1,6%); der mittlere Gehalt beträgt demnach 254,6 mg pro Tablette entgegen 250,0 mg der Deklaration (d.D.).

Tab.8: Berechnung der Tablettenkonzentration aus der Eichfunktion und deren Abweichungen vom deklarierten Gehalt nach UV-Derivativ-Spektroskopie (d^1A)

DECHOLIN^{R}-Tablette Nr.	Konz. [mg/ml] aus Eichfkt.	% d.D.
1	2,55	102,0
2	2,53	101,2
3	2,49	99,6
4	2,56	102,4
5	2,60	104,0
		$\bar{x}$ = 101,8%
		s = 1,61
		VK = 1,6%

Fluoreszenz-Methode

Die Tablettenlösungen der UV-Messung werden mit 0,1 N-NaOH auf die für eine fluorimetrische Bestimmung notwendige Konzentration verdünnt und in die Reaktion eingesetzt. Der Mittelwert aus jeweils zehn Messungen pro Tablette wird einer neu erstellten Eichgerade entnommen (Abb.13).



$y = 0,07 + 3,12\ x$
$r = 0,9996$

Abb.13: Eichgerade für die Dehydrocholsäurefluoreszenzreaktion (DHS in 0,1 N-NaOH gelöst)

Die so erhaltenen Konzentrationen der einzelnen Tabletten (Tab.9) differieren stärker als bei der UV-Bestimmung, was jedoch schon allein durch die Probenvorbereitung bedingt ist. Der Durchschnittsgehalt liegt bei 100,4%, also niedriger. Die Standardabweichung und der Variationskoeffizient sind erwartungsgemäß höher. Die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für dieselbe Tablette verdeutlichen die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der jeweiligen zehn Messungen (siehe Exp. Teil).

Tab.9: Berechnung der Tablettenkonzentration aus der Eichfunktion und deren Abweichungen vom deklarierten Gehalt nach der Fluoreszenzmethode

DECHOLIN^{R}-Tablette Nr.	Konz.d.Reaktionslösung [µg/ml] aus Eichfkt.	% d.D.
1	1,43	102,9
2	1,41	101,4
3	1,33	95,7
4	1,37	98,6
5	1,44	103,6
		$\bar{x}$ = 100,4%
		s = 3,27
		VK = 3,3%

Diskussion

Um die beiden Bestimmungsmethoden miteinander vergleichen zu können, kommt der F-Test (Vergleich von Varianzen) zur Anwendung[41]. Die Varianz ist das Quadrat der Standardabweichung s.
Der F-Test dient zur Beurteilung der Absolutwerte von Standardabweichungen zweier in sich homogener Datengruppen - hier die Ergebnisse der UV- und der Fluoreszenz-Messung. Aus der Anzahl der Einzeldaten $n_{1,2}$ und $s_{1,2}$ der beiden Wertegruppen berechnet sich die Prüfgröße PF, die mit den von den Freiheitsgraden f= n-1 abhängigen statistischen Faktoren zu vergleichen ist. Die statistischen Faktoren F(95), F(99) und F(99,9) werden den F-Tabellen entnommen.

$$PF = \left(\frac{s_1}{s_2} \right)^2$$

Es gilt: für die Fluoreszenz-Methode $n_1=5$ und $s_1=3,27$
für die UV-Methode $n_2=5$ und $s_2=1,61$
Daraus ergibt sich die Prüfgröße von 4,13. Sie ist deutlich kleiner als 6,39 für F(95). Dies bedeutet, daß kein Unterschied zwischen den Standardabweichungen feststellbar ist und beide Methoden zu gleichen Ergebnissen führen.

5.2 Alonimid

5.2.1 Quantitative fluorimetrische Bestimmung

Alonimid zeigt in der Reaktion mit N-1-Methylnicotinamidchlorid eine starke Fluoreszenz. Das Anregungsspektrum (Abb.14a) enthält für verdünnte Lösungen zwei Maxima, eines bei 360 nm und ein zweites intensiveres bei 410 nm. Ein Vergleich mit dem Anregungsspektrum der Referenzlösung verdeutlicht, daß das Maximum bei 360 nm nur durch die Fluoreszenz des Lösungsmittels und der Reagenzien verursacht wird. Eine Erhöhung der Alonimidkonzentration führt in erster Linie zur Erhöhung des Maximums bei 460 nm (Abb.14b).

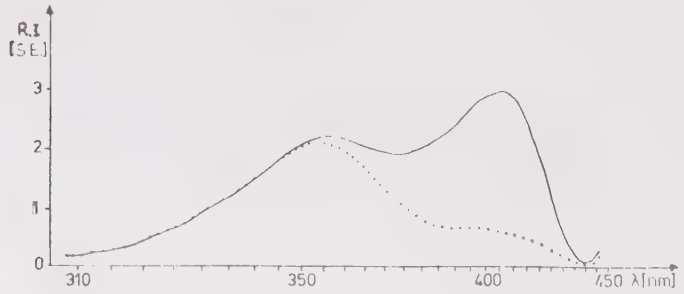


Abb.14a: Anregungsspektrum einer $5,6 \cdot 10^{-7}$ molaren Alonimidreaktionslösung ——— und der Referenzlösung ····· $\lambda_{Ec.}$ var. / 0,15 mm Spalt und λ_{Em} 460 nm / 1,0 mm Spalt

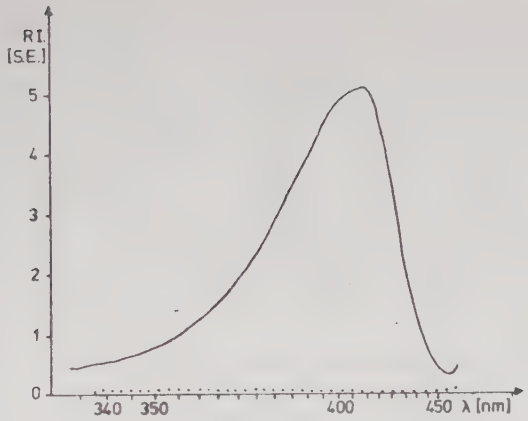


Abb.14b: Anregungsspektrum einer $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ molaren Alonimidreaktionslösung ——— und der Referenzlösung ····· $\lambda_{Ec.}$ var./0,075 mm Spalt und λ_{Em} 460 nm / 1,0 mm Spalt

Das Emissionsspektrum (Abb.15) für $\lambda_{Ec.}$ 410 nm besitzt ein Maximum bei 460 nm. Die Fluoreszenzintensität des Alonimidreaktionsproduktes liegt deutlich oberhalb derjenigen des Dehydrocholsäurereaktionsproduktes - etwa 10 mal höher. Diese Beobachtung ist entweder auf eine vollständigere Umsetzung des Alonimids mit NMN unter den gegebenen Bedingungen zurückzuführen oder auf eine größere Quantenausbeute des entstandenen Fluoreszenzproduktes.

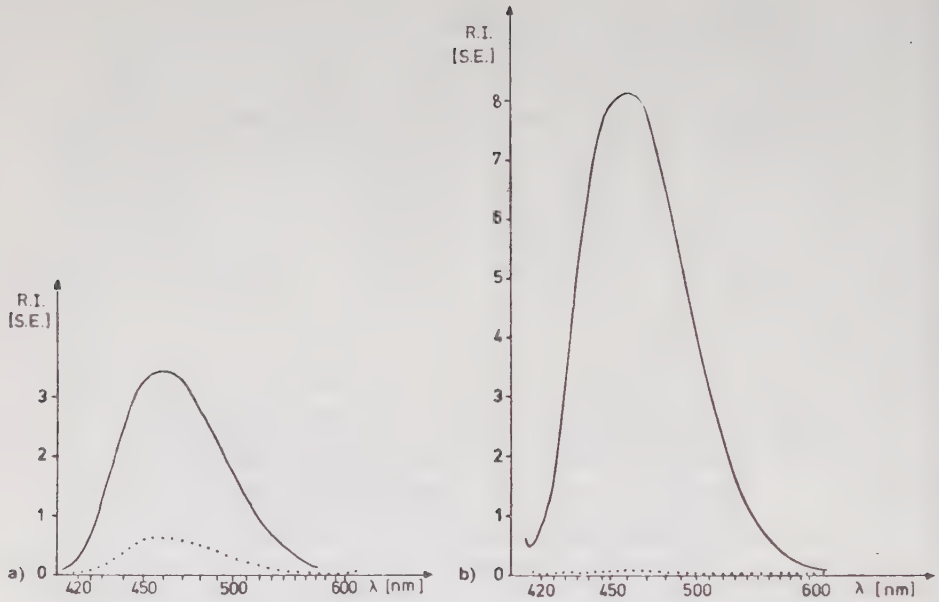


Abb.15: Emissionsspektren einer a) $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ molaren Alonimidreaktionslösung ——— und der Referenzlösung ·····, $\lambda_{Ec.}$ 410 nm / 1,0 mm Spalt und $\lambda_{Em.}$ var. / 0,15 mm Spalt
b) $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ molaren Alonimidreaktionslösung ——— und der Referenzlösung ····· $\lambda_{Ec.}$ 410 nm / 1,0 mm Spalt und $\lambda_{Em.}$ var./ 0,075 mm Spalt

Die Forderung der Proportionalität zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität ist für Alonimid unterhalb 1,5µg/ml Reaktionslösung erfüllt. Die Gleichung der Geraden aus wiederholten Messungen derselben Alonimidkonzentrationsreihe lautet y= 0,13 + 5,40 x; der zugehörige Korrelationskoeffizient r= 0,9996 (Abb.16a). Die Variationskoeffizienten der einzelnen Meßwerte (n= 3) streuen zwischen 2,2 und 0,3%; für 0,13µg/ml 1,7%, für 0,67µg/ml 0,8% und für 1,33µg/ml 0,3%.

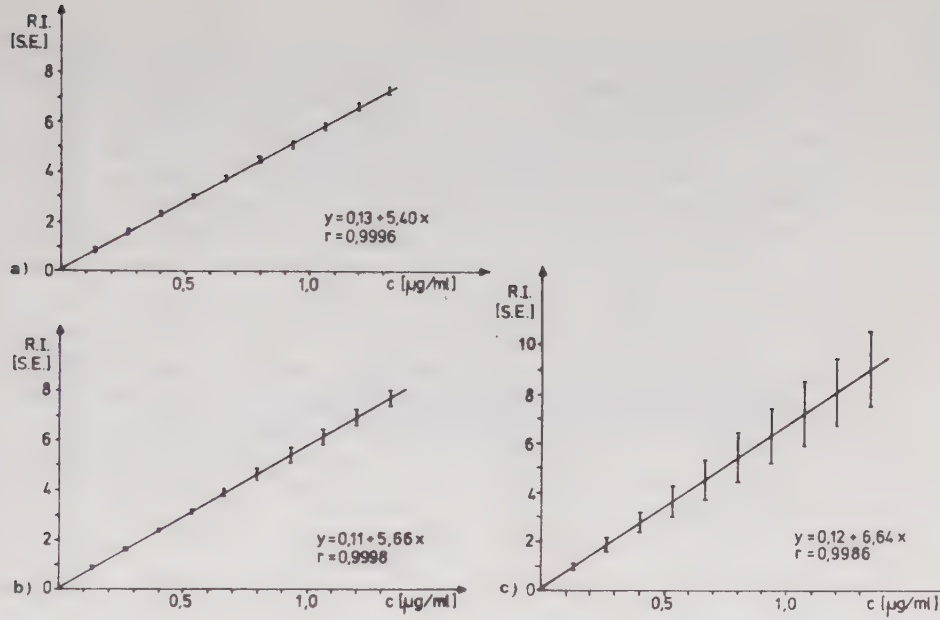


Abb.16: Regressionsgeraden für die Alonimidfluoreszenzreaktion
a) aus wiederholten Messungen derselben Alonimidkonzentrationsreihe
b) aus Messungen verschiedener Alonimidkonzentrationsreihen am selben Tag
c) aus Messungen verschiedener Alonimidkonzentrationsreihen an verschiedenen Tagen

Führt man an einem Tag Messungen von zehn Alonimidkonzentrationsreihen durch, so erhält man ähnliche Variationskoeffizienten: für 0,13µg/ml 7%, für 0,67µg/ml 5,8% und für 1,33µg/ml 3,8% (Abb.16b). Entsprechend der Dehydrocholsäure zeigen Messungen verschiedener Alonimidkonzentrationsreihen an verschiedenen Tagen größere Abweichungen (Abb.16c). Ein Einfluß auf die Proportionalität zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität wird jedoch nicht beobachtet. Die Variationskoeffizient der Einzelwerte (n= 6) berechnen sich für 0,13µg/ml zu 17%, für 0,67µg/ml zu 17,8% und für 1,33µg/ml zu 17,3%.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze[35] für die fluorimetrische Bestimmung von Alonimid liegt bei etwa 2 ng/ml Reaktionslösung entsprechend $1,48 \cdot 10^{-11}$ Mol in die Reaktion eingesetztes Alonimid oder $8,2 \cdot 10^{-9}$ mol/l. ($\underline{x} = \bar{x}_{Bl} + m\, s_{x_{Bl}} : \bar{x}_{Bl} = 0,08$; n= 15; m= 6; s= 0,0198; $\underline{x}$= 0,20).

5.2.2 UV-Bestimmung

Das UV-Spektrum des Alonimids in Methanol (Abb.17) weist insgesamt drei Maxima auf - 287 nm, 247 nm und 212 nm.

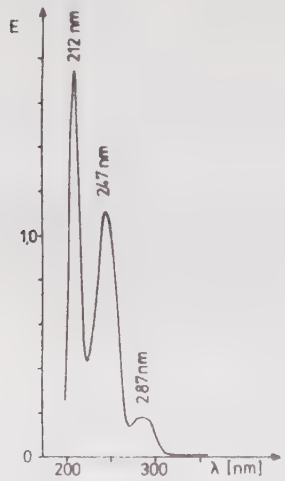


Abb.17: UV-Spektrum des Alonimid in Methanol

Das scharfe Maximum bei 212 nm zeigt den höchsten ε-Wert mit etwa 20 000, dasjenige bei 247 nm 12 400 und das schwächste bei 287 nm 1 750. Für UV-spektroskopische Untersuchungen wird die Wellenlänge 247 nm gewählt, da sie nicht zu nahe am Vakuum-UV liegt und im Gegensatz zum breiten Maximum bei 287 nm relativ steil verläuft. Die Geradengleichung für Alonimid in Methanol aus den Mittelwerten von zehn Messungen in Serie lautet y= 0,05 x, der Korrelationskoeffizient r= 0,9999. Die Variationskoeffizienten (n= 10) liegen für 1,3µg/ml bei 5,0%, für 10,0µg/ml bei 2,5% und für 20,0µg/ml bei 1,9% und fallen gegenüber der fluorimetrischen Bestimmung aufgrund weniger Schritte der Probenvorbereitung und geringerem Geräteeinfluß entsprechend niedriger aus (Abb.18).

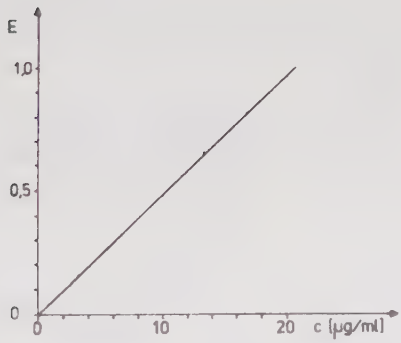


Abb.18: UV-Eichgerade für Alonimid in Methanol bei 247 nm.

5.2.3 Vergleich der fluorimetrischen Methode mit der UV-Bestimmung

Alonimid besitzt im Gegensatz zur Dehydrocholsäure drei Maxima mit relativ hohen ε-Werten. Elektronenspektroskopische Aufnahmen sind daher bereits mit geringer Substanzmenge durchführbar - etwa 10µg/ml (Tab.10). Die Fluoreszenzmethode erlaubt Bestimmungen im ng-Bereich. Der Variationskoeffizient der UV-Messung für eine mittlere Konzentration von 10,0µg/ml beträgt 2,5% gegenüber 5,8% für 0,7µg/ml in der Fluoreszenzbestimmung. Die Empfindlichkeit der fluorimetrischen Methode ist weitaus besser - ungefähr um den Faktor 100 erhöht. Für die Nachweisgrenze ergeben sich 2 ng/ml Reaktionslösung ($8{,}2 \cdot 10^{-9}$ mol/l) im Gegensatz zur UV-Bestimmung mit 85 ng/ml ($3{,}5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) Alonimid für ein Signal/Rausch-Verhältnis von 2 : 1.

Tab.10: Gegenüberstellung der UV-Bestimmung und der Fluoreszenzmethode für Alonimid

	UV-Methode	Fluorimetrische Methode (bezogen auf die Reaktionslsg.)
Konzentrationsbereich	3 -20µg/ml	0,1 - 1,3µg/ml
r	0,9999	0,9996
Variationskoeffizienten (n= 10)	für 1,3µg/ml: 5,0% für 10,0µg/ml: 2,5% für 20,0µg/ml 1,9%	für 0,1µg/ml: 7,0% für 0,7µg/ml: 5,8% für 1,3µg/ml: 3,8%
Empfindlichkeit (Steigung der Regressionsgeraden)	0,049 (Alonimid in Methanol)	5,66
reziproke Empfindlichkeit[38]	für E= 0,0044: 0,12µg/ml 1%Abs.	-
Nachweisgrenze	für ein Signal/Rausch-Verhältnis von 2:1 $3{,}5 \cdot 10^{-7}$mol/l (≙ 85 ng/ml)	$8{,}2 \cdot 10^{-9}$ mol/l[35] (≙2 ng/ml)

6. Strukturaufklärung

Es sollen die Fluoreszenzprodukte der Dehydrocholsäure und des Alonimids aufgeklärt werden.
Zunächst erscheint es zweckmäßiger, die Synthese nach HUFF[10] mit einfachen Modellverbindungen durchzuführen und diese kernresonanzspektroskopisch zu untersuchen. Für die Dehydrocholsäure bieten sich Cyclohexanon und 2-Decalon an; für das Alonimid erscheint α-Tetralon geeignet.

6.1 Reaktionsprodukt aus Cyclohexanon und N-1-Methylnicotinamidchlorid

Im 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum (Abb.19) des Hauptsyntheseproduktes aus Cyclohexanon und NMN zeigt sich das vom Acetonfluoreszenzprodukt bereits bekannte ABM-System des 2,7-Naphthyridinringes.

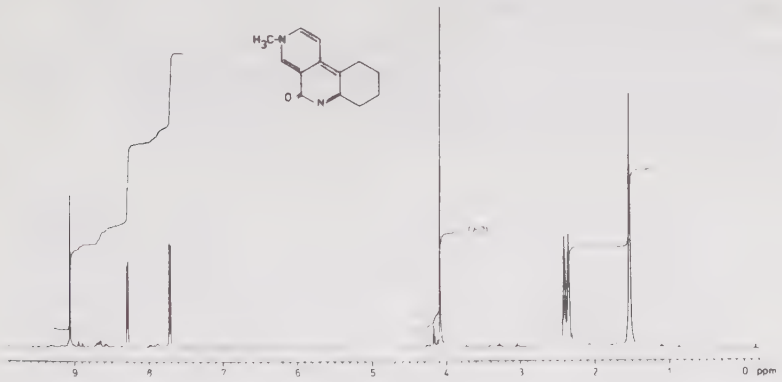
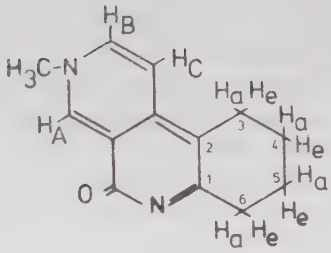


Abb.19: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des isolierten Hauptproduktes (97) aus der Reaktion von Cyclohexanon und NMN , in D_2O/D_2SO_4



97

H_B und H_C treten bei 8.28 und 7.69 ppm in Resonanz (Abb.20). H_B erscheint durch o-Kopplung mit H_C ($^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz) und m-Kopplung mit H_A ($^4J_{H_B,H_A}$ = 1.5 Hz) als Doppeldublett, während H_C lediglich als Dublett aufspaltet ($^3J_{H_C,H_B}$ = 7 Hz). H_A absorbiert bei 9.06 ppm, um etwa 0.7 ppm gegenüber H_B tieffeldverschoben durch das Zusammenwirken des elektronischen und des Anisotropieeffektes der Carbonylgruppe und zeigt eine m-Kopplung mit H_B ($^4J_{H_A,H_B}$ = 1.5 Hz).

Abb.20: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Syntheseproduktes aus Cyclohexanon und NMN in D_2O/D_2SO_4, Aromatenteil gespreizt.

Das Singulett bei 4.09 ppm ist eindeutig der N-Methylgruppe zuzuordnen.
Übrig bleiben zwei Signale bei 2.37 und 1.53 ppm, deren Integrale auf je vier Protonen hinweisen.

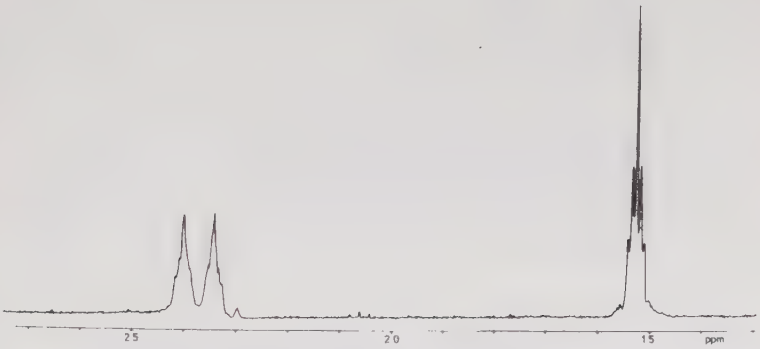
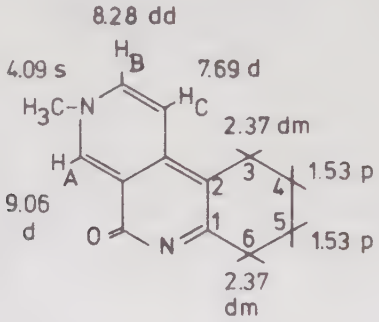


Abb.21: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Hauptsyntheseproduktes aus Cyclohexanon und NMN in D_2O/D_2SO_4, Aliphatenteil gespreizt.

Das Dublett (Abb.21) bei tieferem Feld gehört zu den Protonen 3-H_a, 3-H_e, 6-H_a und 6-H_e, welche durch den anellierten Naphthyridinring entschirmt werden. Zudem tritt eine vergrößerte Geminalkopplung von 23 Hz auf, die ebenfalls von den benachbarten π-Bindungen herrührt. Ihr maximaler Einfluß ist bei einer parallelen Anordnung der Verbindungslinie zwischen den betrachteten Protonen und den benachbarten π-Orbitalen gegeben[42]. Weitere o-Kopplungen mit 4-$H_{a,e}$ bzw. 5-$H_{a,e}$ ($^3J \sim 3$ Hz), leichte Verschiebungsdifferenzen von 3-$H_{a,e}$/6-$H_{a,e}$ und der axialen/äquatorialen Protonen führen zu komplexen Überlagerungen. Insgesamt ist ein Dublett von Multipletts zu erkennen. Durch gleiche chemische Umgebung der Protonen 4-H_a

und 4-H_e bzw. 5-H_a und 5-H_e sind diese äquivalent und absorbieren bei gleicher Frequenz (1.53 ppm) in Analogie zu Cyclohexen (1.60 ppm)[43]. Sie weisen keine Geminalkopplung auf. Die Fernaufspaltung zu einem Quintett ($^3J \sim 3$ Hz) ist durch o-Kopplung von 4-$H_{a,e}$ mit 3-H_a, 3-H_e und 5-$H_{a,e}$ bzw. von 5-$H_{a,e}$ mit 6-H_a, 6-H_e und 4-$H_{a,e}$ zu erklären.



Tab.11: Zugeordnete Protonen des Hauptreaktionsproduktes aus Cyclohexanon und NMN im 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum (97)

ppm	Signal	Kopplungskonstanten	Integral	Zuordnung
9.06	d	$^4J_{H_A,H_B}$ = 1.5 Hz	1H	H_A
8.28	dd	$^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz $^4J_{H_B,H_A}$ = 1.5 Hz	1H	H_B
7.69	d	$^3J_{H_C,H_B}$ = 7 Hz	1H	H_C
4.09	s	---	3H	N-CH_3
2.37	dm	$^2J_{3\text{-}H_a,3\text{-}H_e} = {}^2J_{6\text{-}H_a,6\text{-}H_e}$ = 23 Hz $^3J_{6\text{-}H_a,5\text{-}H_{a,e}} = {}^3J_{6\text{-}H_e,5\text{-}H_{a,e}} = {}^3J_{3\text{-}H_a,4\text{-}H_{a,e}} = {}^3J_{3\text{-}H_e,4\text{-}H_{a,e}}$ = 3 Hz	4H	3-H_a,3-H_e 6-H_a,6-H_e
1.53	p	$^3J_{4\text{-}H_{a,e},3\text{-}H_a,3\text{-}H_e,5\text{-}H_{a,e}} = {}^3J_{5\text{-}H_{a,e},6\text{-}H_a,6\text{-}H_e,4\text{-}H_{a,e}}$ = 3 Hz	4H	4-$H_{a,e}$ 5-$H_{a,e}$

6.2 Reaktionsprodukt aus 2-Decalon und N-1-Methylnicotinamidchlorid

Für das 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des isolierten Decalon-NMN-Syntheseproduktes (Abb.22) lassen sich analog zu den bereits charakterisierten Fluoreszenzverbindungen im Aromatenbereich folgende Zuordnungen treffen:
H_A erscheint als breites Singulett bei 9.27 ppm (m-Kopplung mit H_B nicht aufgelöst). Das Doppeldublett bei 8.49 ppm gehört zu H_B ($^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz, $^4J_{H_B,H_A}$ = 1.5 Hz), während H_C bei 7.91 ppm als Dublett ($^3J_{H_C,H_B}$ = 7 Hz) absorbiert. Die starke Tieffeldverschiebung von H_A gegenüber H_B um etwa 0.7 ppm ist auch hier durch das Zusammenwirken des elektronischen und des Anisotropieeffektes der Carbonylgruppe bedingt (vergleiche Aceton- und Cyclohexanon-NMN-Syntheseprodukte). Die N-Methylgruppe läßt sich dem Singulett bei 4.29 ppm zuordnen.

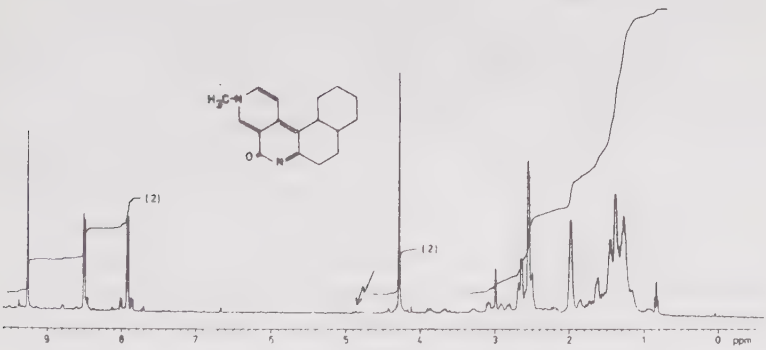
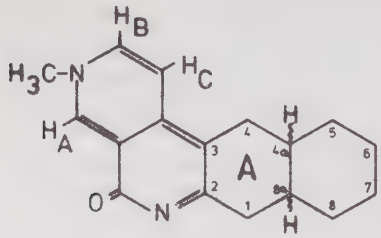


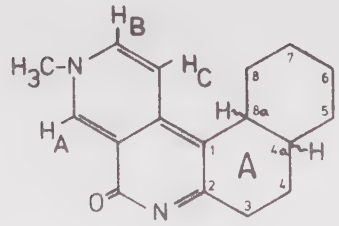
Abb.22: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des isolierten Hauptproduktes aus der Reaktion von 2-Decalon und NMN in D_2O/D_2SO_4

Die übrigen Signale im Bereich von 3 bis 1.10 ppm gehören zu den Protonen des Decalinringes. Da es für die Reaktion von 2-Decalon mit NMN verschiedene Umsetzungsmöglichkeiten gibt, muß zunächst zwischen zwei Hauptformen unterschieden werden:
Ringschluß über C-3 ergibt Syntheseprodukt I



I

und Ringschluß über C-1 führt zum Syntheseprodukt II



II

Weitere Variationsmöglichkeiten sind durch die Konformation des 2-Decalons gegeben (cis oder trans). In beiden Verbindungen I und II erscheinen die Protonen 5,6,7,8-H_8 hochfeld bei 1.7 bis 1.1 ppm als Multipletts.
Das Hauptunterscheidungsmerkmal der beiden Reaktionsprodukte I und II bieten die Protonen des Ringes A. Für die Verbindung I müßten Ähnlichkeiten zum Cyclohexanon-NMN-Produkt zu erkennen sein, d.h. die chemischen Verschiebungen der Protonen 1-$H_{a,e}$ und 4-$H_{a,e}$ dürften nur geringe Differenzen

aufweisen; zudem müßte die charakteristische Geminalkopplung von ungefähr 20 Hz mit weiterer o-Kopplung zu 4a-H bzw. 8a-H auftreten. Aufgrund ihrer gleichen chemischen Umgebung sollten 4a-H und 8a-H als komplexe Multipletts bei gleicher Frequenz absorbieren. Zusammenfassend wären damit für I folgende Protonensignale des Ringes A zu erwarten: für 1-H_a, 1-H_e, 4-H_a und 4-H_e ein Signal mit vierfacher Intensität bei etwa 2.4 ppm als Dublett (Geminalkopplung mit etwa 20 Hz) von Dubletts (Vicinalkopplung mit 4a-H bzw. 8a-H), welches durch Verschiebungsdifferenzen der axialen/äquatorialen Protonen und 1-$H_{a,e}$ und 4-$H_{a,e}$ als Dublett von Multipletts erscheinen müßte. 4a-H und 8a-H sollten bei 2.6 ppm mit doppelter Intensität als Multiplett in Resonanz treten. Stattdessen zeigt das 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum zwei Signale einfacher Intensität bei 2.99 und 2.65 ppm und zwei Signale doppelter Intensität bei 2.52 und 1.98 ppm (Abb.22).

Das Auftreten dieser getrennten Signale spricht für das Produkt II, da hier aufgrund der fehlenden Symmetrieebene verschiedene Protonenresonanzen zu erwarten sind. Das Signal bei 2.99 ppm (Abb.23) läßt sich 8a-H zuordnen, welches durch die auftretenden van-der-Waals-Wechselwirkungen mit H_C tieffeldverschoben in Resonanz tritt. Da keine Fernaufspaltungen zu beobachten sind, muß eine cis-Stellung zu 4a-H angenommen werden, denn J_{vic} zeigt eine starke Abhängigkeit vom Diederwinkel. Bei trans-Stellung des Decalinringes wäre durch den Diederwinkel 4a-H/8a-H $\sim 180°$ eine maximale Vicinalkopplung ($\sim$10 Hz) zu erwarten! Damit kann eindeutig eine cis-Stellung im isolierten Reaktionsprodukt vorausgesetzt werden. o-Kopplungen von 8a-H mit 8-$H_{a,e}$ lassen sich nur andeutungsweise erkennen. 4a-H absorbiert bei 2.65 ppm und wird durch Vicinalkopplungen mit 4-H_a, 4-H_e und 5-$H_{a,e}$ zu einem Multiplett angespalten. Die genaue Interpretation wird zudem durch das mögliche Auftreten von long-range-Kopplungen erschwert, die in kondensierten Alicyclen dann beobachtet werden, wenn die Bindungen zwischen den beiden

Protonen W-förmig sind ("W-Mechanismus")[44]. 4-$H_{a,e}$ erscheinen durch Vicinalkopplungen mit 3-H_a, 3-H_e und 4a-H als breites Multiplett bei 1.98 ppm. 3-H_a und 3-H_e lassen sich dem Signal bei 2.52 ppm zuordnen ($^2J_{3\text{-}H_a,3\text{-}H_e} \sim 6$ Hz).

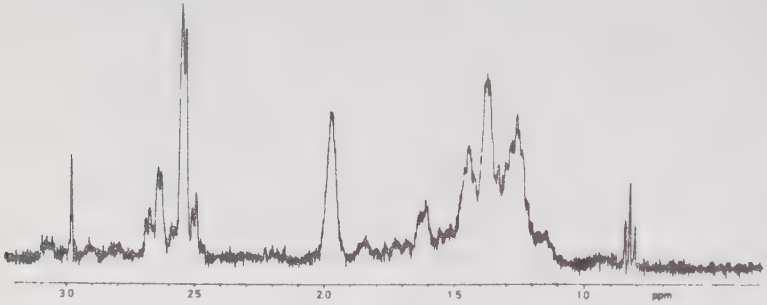


Abb.23: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Hauptproduktes aus der Reaktion von 2-Decalon mit NMN in D_2O/D_2SO_4; Aliphatenteil gespreizt

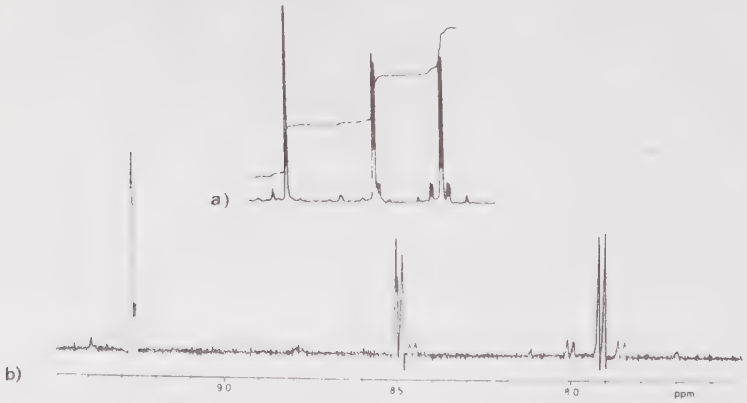
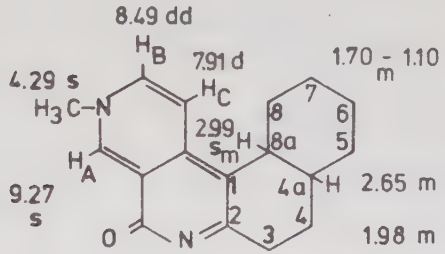


Abb.24: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Hauptproduktes aus der Reaktion von 2-Decalon mit NMN in D_2O/D_2SO_4; a) Aromatenteil, b) Aromatenteil gespreizt

Als Hauptprodukt der Synthese ist die cis-Verbindung der Struktur II durch das 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum bewiesen. Im Aromatenbereich (Abb.24) zeigen sich zusätzlich Verdopplungen der Hauptsignale, die auf die Bildung von zwei Nebenisomeren hinweisen, deren genaue Interpretation jedoch offen bleiben muß, da im Aliphatenbereich starke Überlappungen auftreten.



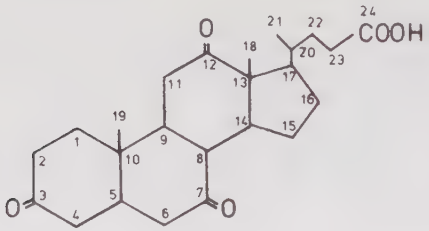
98

Tab.12: Zugeordnete Protonen des Hauptreaktionsproduktes aus 2-Decalon und NMN im 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum (98)

ppm	Signal	Kopplungskonstanten	Integral	Zuordnung
9.27	s	-	1H	H_A
8.49	dd	$^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz	1H	H_B
		$^4J_{H_B,H_A}$ = 1.5 Hz		
7.91	d	$^3J_{H_C,H_B}$ = 7 Hz	1H	H_C
4.29	s	-	3H	N-CH_3
2.99	sm	-	1H	8a-H
2.65	m	-	1H	4a-H
2.52	dm	$^2J_{3\text{-}H_a,3\text{-}H_e} \sim 6$ Hz	2H	3-H_a,3-H_e
1.98	m	-	2H	4-$H_{a,e}$
1.70-1.10	m	-	8H	5,6,7,8-H_8

6.3 Reaktionsprodukt aus Dehydrocholsäure und N-1-Methylnicotinamidchlorid

Die Dehydrocholsäure (70) besitzt mit ihren drei Carbonylfunktionen in 3-, 7- und 12-Stellung theoretisch drei Angriffspunkte für die Umsetzung mit der Säureamidgruppierung des N-1-Methylnicotinamidchlorids (NMN).



(70)

Für das isolierte Hauptprodukt der Synthese zeigt das Integral des 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrums (Abb.25), daß keine Mehrfachsubstitution an der Dehydrocholsäure eingetreten ist. Wie für eine Einfachsubstitution erwartet weist das Spektrum sechs Protonen für den Naphthyridin- und 31 Protonen (in D_2O Austausch des Carbonylprotons) für den Steroidteil auf. Es liegt ein 1 : 1 Verhältnis (Dehydrocholsäure/NMN) vor.

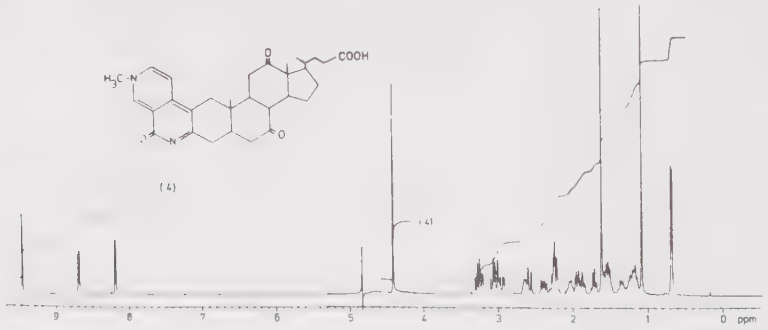


Abb.25: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des isolierten Hauptproduktes aus der Reaktion von Dehydrocholsäure und NMN in D_2O/D_2SO_4

Die N-Methylgruppierung des Naphthyridinteiles tritt bei 4.42 ppm als Singulett in Resonanz. Das Aufspaltungsmuster (ABM-System) der olefinischen Protonen zeigt, daß sich analog zu dem Umsetzungsprodukt von NMN mit Aceton das 2,7-Naphthyridinderivat gebildet hat (Abb.26).

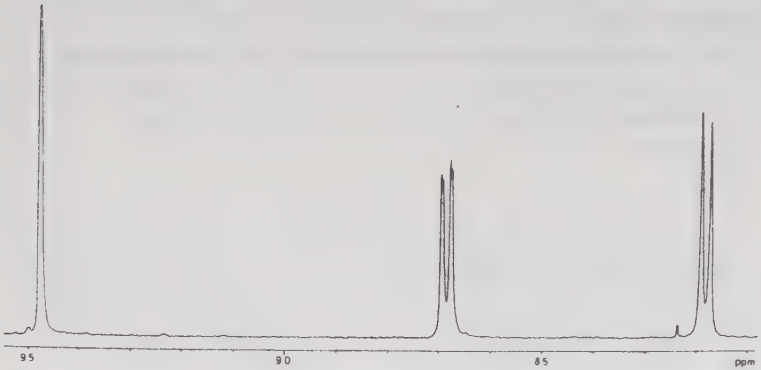
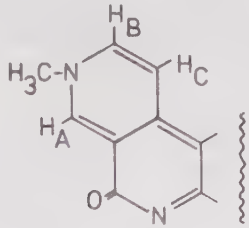
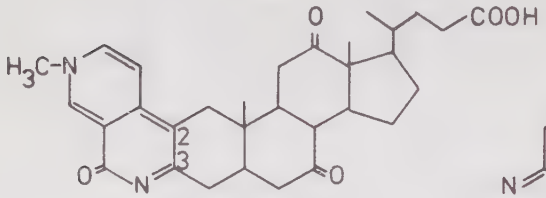


Abb.26: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Syntheseproduktes aus Dehydrocholsäure und NMN, in D_2O/D_2SO_4; Aromatenteil gespreizt

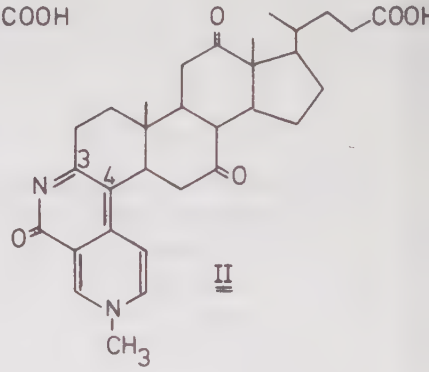


H_B und H_C treten bei 8.68 bzw. 8.18 ppm in Resonanz. Durch o-Kopplungen besitzen beide Signale eine Dublettaufspaltung von $^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz. Das Signal von H_B zeigt neben der Kopplung mit H_C eine weitere Aufspaltung, die von der Kopplung

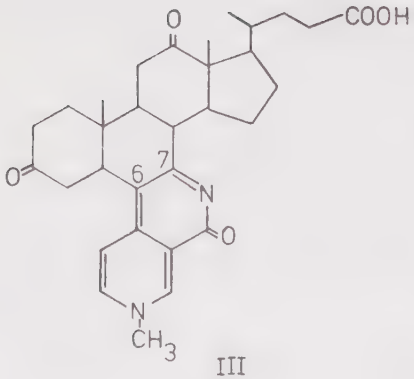
mit H_A herrührt ($^4J_{H_A,H_B}$ = 1.1 Hz). H_A tritt bei 9.47 ppm als breites Singulett in Erscheinung. Die Kopplung von 1.1 Hz mit H_B ist nur andeutungsweise erkennbar. Unter der Annahme einer Monosubstitution kann jeweils nur ein einziges Produkt aus der Reaktion des NMN am C-7 bzw. C-12 der Dehydrocholsäure hervorgehen - Ringschluß über C-6 bzw. C-11 (III bzw. IV). Bei der Umsetzung mit der Ketogruppe am C-3 der Dehydrocholsäure dagegen können zwei denkbare Substitutionsprodukte auftreten, je nachdem, ob der Ringschluß zum Naphthyridinderivat über C-4 (II) oder über C-2 (I) erfolgt.



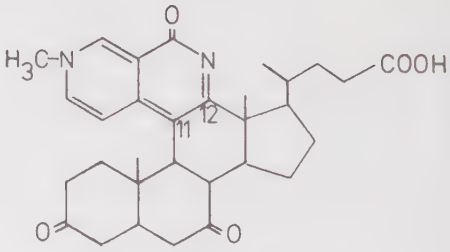
I



II



III



IV

Welches der vier möglichen Strukturisomeren entstanden ist, kann ein Vergleich der 400MHz-^{1}H-NMR-Spektren der reinen Dehydrocholsäure und des Reaktionsproduktes entscheiden. In der Literatur sind bisher nur sehr wenige Daten aus 400MHz-^{1}H-NMR-Spektren bekannt; dagegen gibt es für die ^{13}C-NMR-Zuordnung aus Steroid-Spektren bereits ausreichend Informationen. Um eine sichere Zuordnung der Methylprotonen der Dehydrocholsäure treffen zu können, wird zunächst ein ^{13}C-NMR-Spektrum der Dehydrocholsäure aufgenommen und nur auf die Methylgruppen hin untersucht (Abb.27).

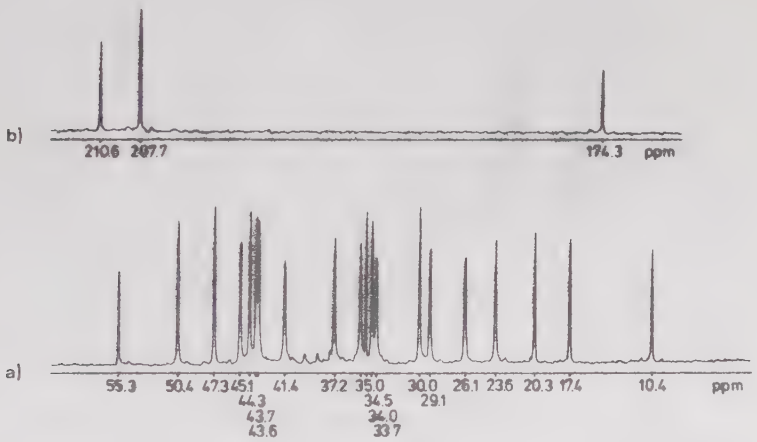


Abb.27: 20.115MHz-{^{1}H}-breitbandentkoppeltes-^{13}C-NMR-Spektrum der Dehydrocholsäure in DMSO : $CDCl_3$ / 30 : 70
a) Aliphatenteil b) Aromatenteil

Entsprechend der chemischen Verschiebung ähnlicher Steroide wie Coprostan[45] (18-CH_3: 12.1 ppm, 19-CH_3: 24.4 ppm, 21-CH_3: 18.8 ppm), 5ß-Cholestan-3-on[46] (18-CH_3: 12.1 ppm, 19-CH_3: 22.7 ppm, 21-CH_3: 18.7 ppm) und der Cholansäure[46,47] (18-CH_3: 12.8 ppm, 19-CH_3: 22.8 ppm, 21-CH_3: 17.6 ppm) werden die

Methylgruppen der Dehydrocholsäure zugeordnet. Demnach tritt bei 17.4 ppm die 21-CH_3-Gruppe in Resonanz. Die beiden angulären Methylgruppen 18-CH_3 und 19-CH_3 absorbieren bei 10.4 und 20.3 ppm.
Anschließend wird ein ^{1}H-NMR-Spektrum des Dehydrocholsäure-Natrium-Salzes gemessen. Eine vorläufig getroffene Zuordnung der Methylprotonen im ^{1}H-NMR-Spektrum soll durch ein selektives Protonenentkopplungsexperiment im ^{13}C-NMR-Spektrum bestätigt werden.

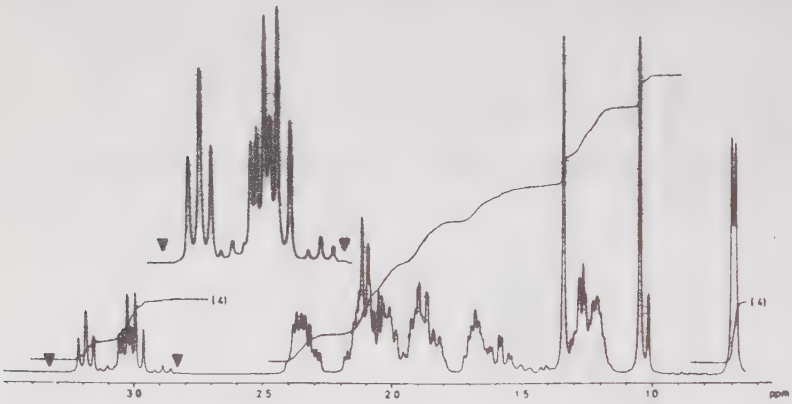


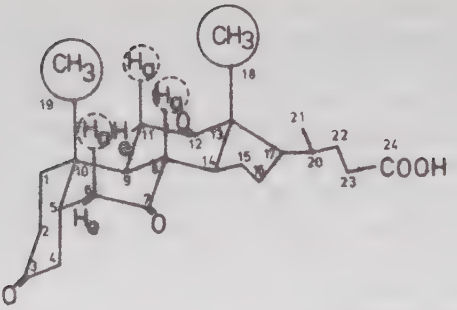
Abb.28: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Dehydrocholsäure-Natrium-Salzes in D_2O; Aliphatenteil gespreizt

Die Methylgruppe der Seitenkette (21-CH_3) der Dehydrocholsäure erscheint im 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum (Abb.28) als Dublett bei 0.68 ppm ($^3J_{21\text{-}H,20\text{-}H}$ = 6 Hz). Die angulären Methylgruppen 18-CH_3 und 19-CH_3 absorbieren entsprechend der Zuordnung des Dihydrotestosteronacetats und des 3α - Acetoxy-12-ketocholansäuremethylesters[48] bei 1.04 und 1.33 ppm. Im Dihydrotestosteronacetat tritt die Methylgruppe 18-CH_3 bei 0.80 ppm und die 19-CH_3-Gruppe bei 1.03 ppm in Resonanz. Durch Einführen einer Ketofunktion in Position C-12

wird die anguläre Methylgruppe 18-CH_3 durch den negativen induktiven Effekt tieffeld verschoben (von 0.80 nach 1.03 ppm). In der Dehydrocholsäure addieren sich die Einflüsse zweier Ketofunktionen in C-3 und C-7 Stellung auf die 19-CH_3-Gruppe. Daraus resultiert eine zweifache Entschirmung und stärkere Tieffeldverschiebung gegenüber 18-CH_3. Den Beweis für die getroffene Zuordnung liefert die selektive Protonenentkopplung im ^{13}C-NMR-Spektrum. Während der Aufnahme des ^{13}C-NMR-Spektrums wird die aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum erhaltene Lamorfrequenz der zu entkoppelnden Protonen nacheinander eingestrahlt. Dann erscheint nur das C-Atom als intensives Singulett, dessen direkt gebundene Wasserstoffatome entkoppelt werden. Voraussetzung für diese Technik ist ein genügend großer Abstand der Entkopplerfrequenzen zu weiteren Protonensignalen in diesem Bereich. Es werden nacheinander die Protonenfrequenzen 5831.047 Hz (0.68 ppm), 5851.799 Hz (1.04 ppm) und 5878.654 Hz (1.33 ppm) eingestrahlt. Wie erwartet erscheinen die Signale im ^{13}C-NMR-Spektrum bei 17.4 (21-CH_3), 10.4 (18-CH_3) und 20.3 ppm (19-CH_3) als scharfe Singuletts.

Die chemische Verschiebung der Methylprotonen in der Dehydrocholsäure wird aufgrund der selektiven Protonenentkopplung im ^{13}C-NMR-Spektrum als auch durch Vergleich mit anderen Verbindungen als gesichert angesehen.

Zwischen 3.0 und 3.5 ppm treten, wie aus dem Integral ersichtlich ist, drei Protonen in Resonanz. Die exponierte Lage dieser Protonen kommt durch die Überlagerung zweier entschirmender Einflüsse zustande. Es handelt sich hierbei um den -I-Effekt der Carbonylfunktionen in Verbindung mit dem sterischen Effekt der angulären Methylgruppen. Ersterer wirkt sich sowohl auf die äquatorialen, als auch auf die axialen, in Nachbarschaft zu Carbonylgruppen liegenden Protonen 6-$H_{a,e}$, 8-H und 11-$H_{a,e}$ aus; der γ-Effekt dagegen beeinflußt ausschließlich die axial ständigen Wasserstoffatome 6-H_a, 8-H und 11-H_a.

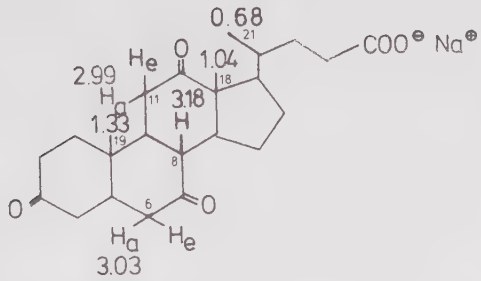


6-H_a läßt sich anhand seiner Kopplungen erkennen. Es erscheint bei 3.03 ppm als Doppeldublett. Bei der großen Aufspaltung handelt es sich um die Geminalkopplung mit 6-H_e ($^2J_{6\text{-}H_e,6\text{-}H_a}$ = 13.2 Hz). Die kleinere Kopplungskonstante von 5.6 Hz rührt von einer axialen/äquatorialen (äquatorial bezogen auf Ring B) Kopplung mit 5-H her.

Sowohl die für die Geminal- und axial/äquatorial-Kopplung (6-H_a, 5-H) gefundenen Werte als auch die nachfolgenden stimmen gut mit den von Hall und Sanders[49,50] ermittelten Kopplungskonstanten in Steroiden überein. Die bei 3.18 und 2.99 ppm absorbierenden Protonen bilden scheinbare Tripletts mit 12.5 und 12.7 Hz. Die Zuordnung muß in diesem Falle aufgrund der chemischen Verschiebung getroffen werden: 8-H_a und 11-H_a besitzen - wie aus dem Dreiding-Modell der Dehydrocholsäure hervorgeht - gleichen Abstand zu den angulären Methylgruppen, jedoch liegt 8-H_a im Entschirmungsbereich des Anisotropiekegels der Carbonylgruppe an C-12. Somit ist das scheinbare Triplett bei 3.18 ppm 8-H_a zuzuordnen; es entsteht durch Überlagerung der axial/axial-Kopplung von 8-H_a mit 9-H und 14-H ($^3J_{8\text{-}H,9\text{-}H} = {}^3J_{8\text{-}H,14\text{-}H}$ = 12.5 Hz). 11-H_a absorbiert bei 2.99 ppm. Das scheinbare Triplett resultiert hier durch Überlagerung der Geminalkopplung mit 11-H_e ($^2J_{11\text{-}H_e,11\text{-}H_a}$ = 12.7 Hz) und der axial/axial-Kopplung mit 9-H ($^3J_{11\text{-}H_a,9\text{-}H}$ = 12.7 Hz)(Tab.13).

Tab.13: Zugeordnete Protonen des Dehydrocholsäure-Natrium-Salzes im 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum

ppm	Signal	Kopplungskonstanten	Integral	Zuordnung
3.18	t	$^3J_{8\text{-}H,9\text{-}H} = {}^3J_{8\text{-}H,14\text{-}H}$ = 12.5 Hz	1H	8-H_a
3.03	dd	$^2J_{6\text{-}H_e,6\text{-}H_a}$ = 13.2 Hz $^3J_{6\text{-}H_e,5\text{-}H}$ = 5.6 Hz	1H	6-H_a
2.99	t	$^2J_{11\text{-}H_e,11\text{-}H_a}$ = $^3J_{11\text{-}H_a,9\text{-}H}$ = 12.7 Hz	1H	11-H_a
1.33	s	-	3H	19-CH_3
1.04	s	-	3H	18-CH_3
0.68	d	$^3J_{21\text{-}H,20\text{-}H}$ = 6 Hz	3H	21-CH_3



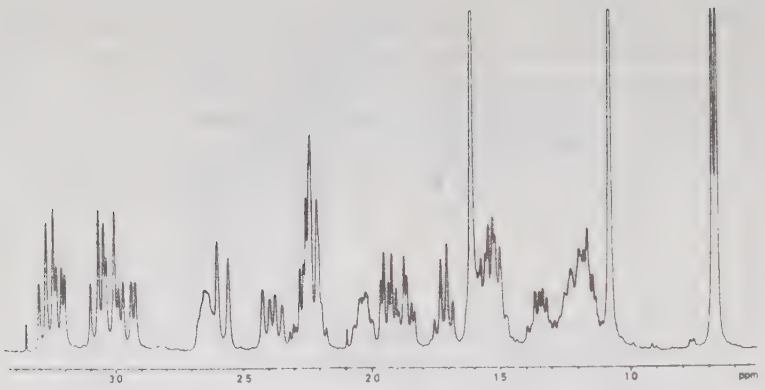
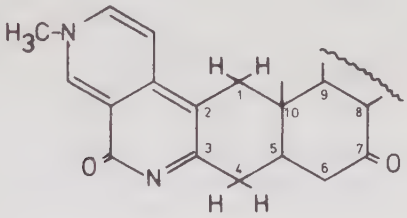


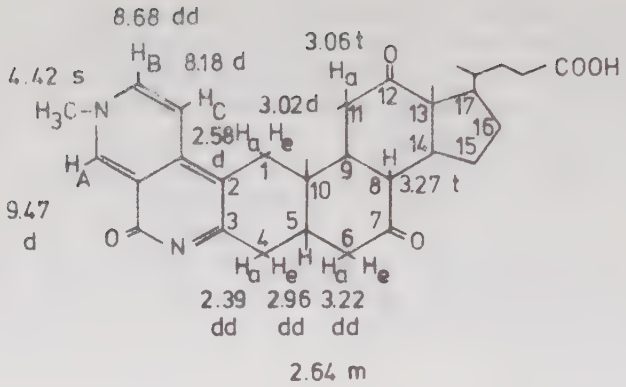
Abb.29: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Syntheseproduktes aus Dehydrocholsäure und NMN in D_2O/D_2SO_4; Aliphatenteil gespreizt

Die Methylgruppen des Reaktionsproduktes treten bei 1.08 (18-CH_3), 1.61 (19-CH_3) und 0.67 (21-CH_3) in Resonanz (Abb.29). 18-CH_3 und 21-CH_3 behalten demnach im Vergleich zur Dehydrocholsäure ihre Lage bei. 19-CH_3 dagegen wird um etwa 0.3 ppm zu tieferem Feld verschoben, was auf eine Substitution der C-3 Carbonylfunktion durch NMN hinweist. Im Bereich von 2.7 bis 3.4 ppm absorbieren fünf Protonen, von denen drei aufgrund ihrer Verschiebungen und Kopplungen als die bereits bei der Dehydrocholsäure beschriebenen axial ständigen Protonen 6-H, 8-H und 11-H erkannt werden. Folglich scheiden von den vier denkbaren Substitutionsprodukten die Verbindungen III und IV - wie schon anhand der Methylgruppenverschiebung vermutet - aus. 6-H_a absorbiert bei 3.22 ppm (Doppeldublett: $^2J_{6\text{-}H_e,6\text{-}H_a}$ = 13.8 Hz; $^3J_{6\text{-}H_a,5\text{-}H}$= 5.6 Hz). 8-$H_a$ und 11-H_a treten bei 3.27 bzw. 3.06 ppm als scheinbare Tripletts ($^3J_{8\text{-}H_a,9\text{-}H} = {}^3J_{8\text{-}H_a,14\text{-}H}$ = 11.3 Hz; $^2J_{11\text{-}H_a,11\text{-}H_e} = {}^3J_{11\text{-}H_a,9\text{-}H}$ = 12.4 Hz) in Resonanz. Die zwei

verbleibenden Protonen sind aufgrund ihrer Verschiebung den Steroidprotonen neben den Kondensationsstellen von NMN und Dehydrocholsäure zuzuordnen. Während das Proton bei 2.96 ppm ein Doppeldublett zeigt, bildet dasjenige bei 3.02 ppm ein reines Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 16.9 Hz. Aus diesem nicht weiter aufgespaltenen Dublett geht hervor, daß der Ringschluß zwischen NMN und Steroid nur über C-2 erfolgt sein kann und demnach das Produkt I vorliegt. I weist als einziges der möglichen Strukturisomeren eine reine Geminalkopplung auf; es handelt sich um das 1e Proton (3.02 ppm).



Auffallend ist dabei die relativ große Geminalkopplung von $^{2}J_{1\text{-}H_e,1\text{-}H_a}$ = 16.9 Hz, welche durch das benachbarte sp^2-hybridisierte Kohlenstoffatom verursacht wird[49]. Das Doppeldublett bei 2.96 ppm ist deshalb 4-H_e (bezüglich Ring A) zuzuordnen ($^{2}J_{4\text{-}H_a,4\text{-}H_e}$ = 19.7; $^{3}J_{4\text{-}H_e,5\text{-}H}$ = 7.1 Hz). Anhand der Geminalkopplungskonstanten lassen sich 1-H_a und 4-H_a (axial bezüglich Ring A) identifizieren. 1-H_a absorbiert bei 2.58 ppm als Dublett ($^{2}J_{1\text{-}H_e,1\text{-}H_a}$ = 16.9 Hz) und 4-H_a bei 2.39 ppm als Doppeldublett. 4-H_a zeigt neben der Geminalkopplung von 19.7 Hz durch axial/axial-Kopplung mit 5-H eine weitere Dublettaufspaltung von $^{3}J_{4\text{-}H_a,5\text{-}H}$ = 11.3 Hz. Das Multiplett bei 2.64 ppm wird 5-H zugeordnet (vier o-Kopplungen mit 4-$H_{a,e}$ und 6-$H_{a,e}$)(Tab.14).

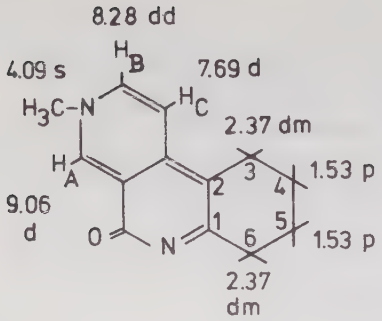


99

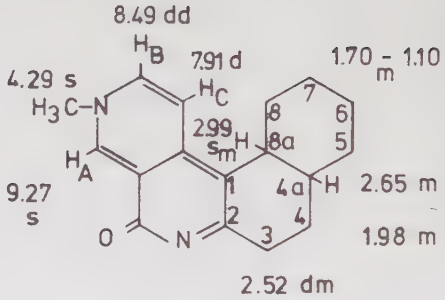
Entgegen dem erwarteten Ringschluß über C-4 zum Syntheseprodukt II - analog zur Umsetzung von 2-Decalon mit N-1-Methylnicotinamidchlorid - entsteht hier als Hauptprodukt die Verbindung I.

Tab.14: Zugeordnete Protonen des Reaktionsproduktes aus NMN und Dehydrocholsäure (99) im 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum

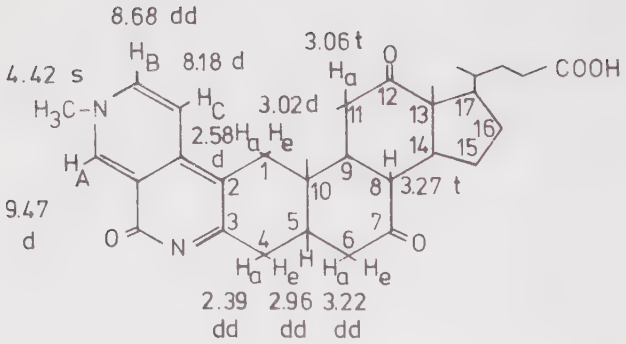
ppm	Signal	Kopplungskonstanten	Integral	Zuordnung
9.47	d	nicht aufgelöst	1H	H_A
8.68	dd	$^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz $^4J_{H_B,H_A}$ = 1.1 Hz	1H	H_B
8.18	d	$^3J_{H_C,H_B}$ = 7 Hz	1H	H_C
4.42	s	-	3H	N-CH_3
3.27	t	$^3J_{8\text{-}H_a,9\text{-}H}$ = $^3J_{8\text{-}H_a,14\text{-}H}$ = 11.3 Hz	1H	8-H_a
3.22	dd	$^2J_{6\text{-}H_a,6\text{-}H_e}$ = 13.8 Hz $^3J_{6\text{-}H_a,5\text{-}H}$ = 5.8 Hz	1H	6-H_a
3.06	t	$^2J_{11\text{-}H_a,11\text{-}H_e}$ = $^3J_{11\text{-}H_a,9\text{-}H}$ = 12.4 Hz	1H	11-H_a
3.02	d	$^2J_{1\text{-}H_a,1\text{-}H_e}$ = 16.9 Hz	1H	1-H_e
2.96	dd	$^2J_{4\text{-}H_a,4\text{-}H_e}$ = 19.7 Hz $^3J_{4\text{-}H_e,5\text{-}H}$ = 7.1 Hz	1H	4-H_e (bzgl. Ring A)
2.64	m	-	1H	5-H
2.58	d	$^2J_{1\text{-}H_a,1\text{-}H_e}$ = 16.9 Hz	1H	1-H_a
2.39	dd	$^2J_{4\text{-}H_a,4\text{-}H_e}$ = 19.7 Hz $^3J_{4\text{-}H_a,5\text{-}H}$ = 11.3 Hz	1H	4-H_a (bzgl. Ring A)
1.61	s	-	3H	19-CH_3
1.08	s	-	3H	18-CH_3
0.67	d	$^3J_{21\text{-}H,20\text{-}H}$ = 7.1 Hz	3H	21-CH_3


8.28 dd
4.09 s
7.69 d
2.37 dm
1.53 p
9.06
d
1.53 p
2.37
dm

97


8.49 dd
7.91 d
1.70 - 1.10
m
4.29 s
2.99
m
9.27
s
2.65 m
1.98 m
2.52 dm

98


8.68 dd
3.06 t
4.42 s
8.18 d
COOH
3.02 d
2.58
d
3.27 t
9.47
d
2.39
dd
2.96
dd
3.22
dd
2.64 m

99

6.4 Reaktionsprodukt aus α-Tetralon und N-1-Methylnicotinamidchlorid

Im 90MHz-^{1}H-NMR-Spektrum (Abb.30) des α-Tetralon-NMN-Hauptreaktionsproduktes zeigt sich wiederum das für das 2,7-Naphthyridingerüst charakteristische ABM-System.

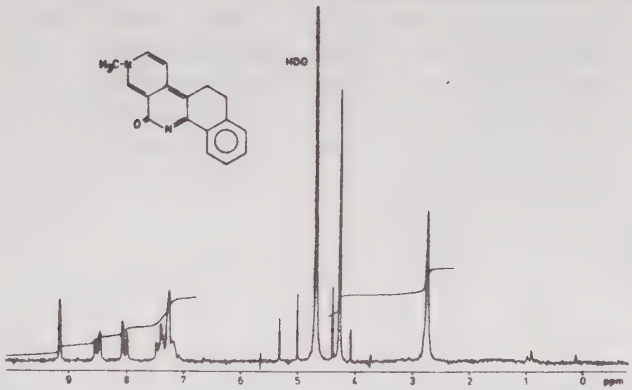


Abb.30: 90MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Hauptsyntheseproduktes aus α-Tetralon und NMN in D_2O/D_2SO_4

H_A erscheint bei 9.10 ppm als breites Singulett, H_B tritt bei 8.44 ppm als Doppeldublett in Resonanz ($^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz, $^4J_{H_B,H_A}$ = 1 Hz), während H_C als Dublett ($^3J_{H_C,H_B}$ = 7 Hz) bei 7.98 ppm absorbiert. Das Signal bei 4.24 ppm gehört zur N-Methylgruppe. Die aromatischen Protonen 5,6,7,8-H_4 sind den Signalen 7.43 bis 7.12 ppm zuzuordnen. 3,4-H_4 passen zum Resonanzsignal bei 2.71 ppm. Zur genaueren Analyse dient ein 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum. Nun zeigen sich im Aromatenbereich des Tetralinringes (Abb.31) deutliche Verschiebungsdifferenzen: 8-H erscheint infolge der Nachbarschaft zum Naphthyridinring bei tiefem Feld (7.47 ppm)

durch o-Kopplung mit 7-H als Dublett ($^3J_{8\text{-H},7\text{-H}}$ = 8 Hz). Das Doppeldublett bei 7.32 ppm, welches als Triplett erscheint, wird 7-H zugeordnet und ist auf zwei o-Kopplungen (mit 8-H: $^3J_{7\text{-H},8\text{-H}}$ = 8 Hz und 6-H: $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}}$ = 7.5 Hz) zurückzuführen. Bei höchstem Feld (7.19 ppm) absorbieren im Aromatenbereich die Protonen 5-H, tieffeldverschoben aufgrund van-der-Waal-Wechselwirkungen, und 6-H. Sie weisen nur geringe Verschiebungsdifferenzen auf. Ihre Aufspaltungsmuster überlagern sich. 5-H (7.21 ppm) koppelt mit 6-H ($^3J_{5\text{-H},6\text{-H}}$ = 7.5 Hz), während 6-H (7.18 ppm) zwei o-Kopplungen mit 5-H und 7-H ($^3J_{6\text{-H},5\text{-H}}$ = $^3J_{6\text{-H},7\text{-H}}$ = 7.5 Hz) zeigt. Die Feinaufspaltungen sind durch m-Kopplungen bedingt.

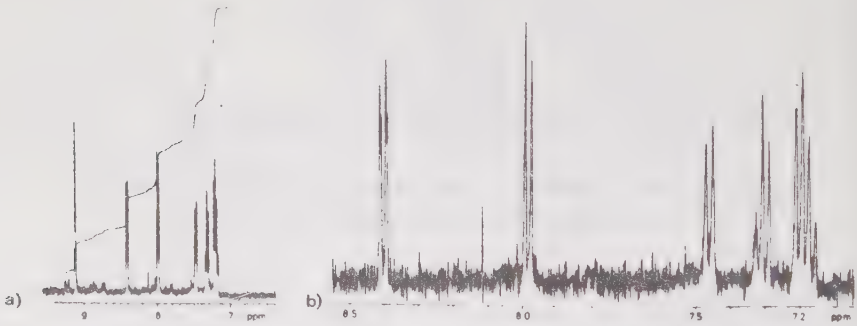


Abb.31: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Hauptsyntheseproduktes aus α-Tetralon und NMN in D_2O/D_2SO_4; a) Aromatenteil b) Aromatenteil gespreizt

Auch im Aliphatenteil ist durch das 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum (Abb.32) eine Unterscheidung von 3-H_2 und 4-H_2 möglich. 3-H_2 erscheinen durch Nachbarschaft zum Naphthyridinring tieffeld bei 2.76 ppm und sind durch Geminal- und o-Kopplungen zu 4-H_2 aufgespalten. Die Protonen 4-H_2 absorbieren bei etwas höherem Feld (2.70 ppm).

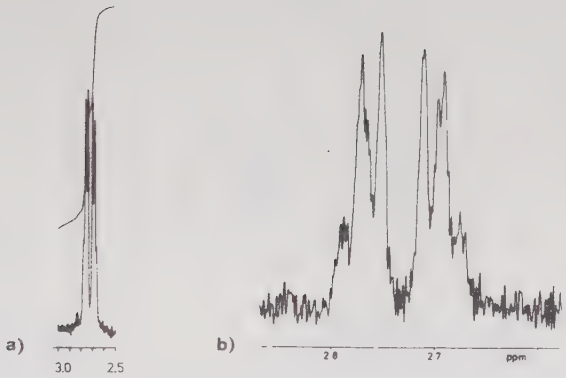
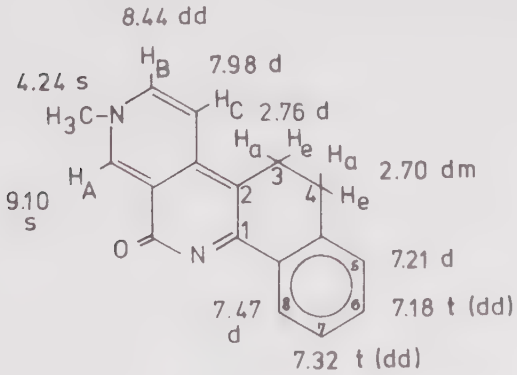


Abb.32: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Hauptsyntheseproduktes aus α-Tetralon und NMN in D_2O/D_2SO_4; a) Aliphatenteil b) Aliphatenteil gespreizt



Tab.15: Zugeordnete Protonen des Hauptsyntheseproduktes aus α-Tetralon und NMN(100)

ppm	Signal	Kopplungskonstanten	Integral	Zuordnung
9.10	s	-	1H	H_A
8.44	dd	$^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz $^4J_{H_B,H_A}$ = 1 Hz	1H	H_B
7.98	d	$^3J_{H_C,H_B}$ = 7 Hz	1H	H_C
7.47	d	$^3J_{8\text{-H},7\text{-H}}$ = 8 Hz	1H	8-H
7.32	t (dd)	$^3J_{7\text{-H},8\text{-H}}$ = 8 Hz $^3J_{7\text{-H},6\text{-H}}$ = 7.5 Hz	1H	7-H
7.19			2H	
7.21	d	$^3J_{5\text{-H},6\text{-H}}$ = 7.5 Hz	1H	5-H
7.18	t (dd)	$^3J_{6\text{-H},5\text{-H}} = {}^3J_{6\text{-H},7\text{-H}}$ = 7.5 Hz	1H	6-H
4.24	s	-	3H	$N\text{-}CH_3$
2.76	dm		2H	$3\text{-}H_2$
2.70	dm	-	2H	$4\text{-}H_2$

6.5 Reaktionsprodukt aus Alonimid und N-1-Methylnicotinamid-chlorid

Im 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des isolierten Hauptproduktes aus der Synthese von Alonimid mit NMN erkennt man sofort die charakteristischen Signale des ABM-Systems eines 2,7-Naphthyridingerüstes (Abb.33): H_A absorbiert bei 9.08 ppm als

verbreitertes Singulett (m-Kopplung mit H_B nur andeutungsweise zu erkennen), H_B tritt bei 8.29 ppm als Doppeldublett in Resonanz ($^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz, $^4J_{H_B,H_A} \sim 1$ Hz) und H_C erscheint bei 7.88 ppm als Dublett ($^3J_{H_C,H_B}$ = 7 Hz). Die N-Methylgruppe zeigt sich bei 4.05 ppm.

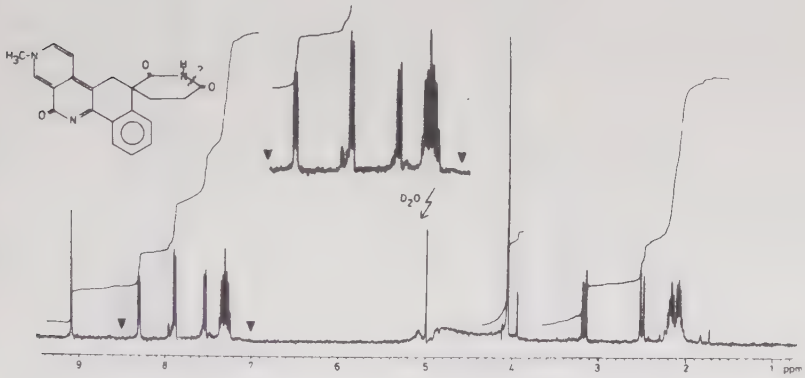


Abb.33: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Reaktionsproduktes aus Alonimid und NMN in D_2O/D_2SO_4

Weitere Signale im Aromatenbereich sind auf den Phenylteil des Alonimids zurückzuführen: bei tiefstem Feld erscheint 8-H (7.54 ppm), welches durch o-Kopplung mit 7-H zu einem Dublett aufgespalten wird ($^3J_{8\text{-H},7\text{-H}}$ = 7 Hz). Das Septett mit dreifacher Intensität bei 7.30 ppm entsteht durch Überlagerung der Signale für 5-H, 6-H und 7-H. Sie weisen geringe Verschiebungsdifferenzen und o-Kopplungen mit den benachbarten Protonen auf ($^3J \sim 7$ Hz).
Im Aliphatenbereich (Abb.34) erscheint bei 3.17 und 2.51 ppm ein AB-System mit J_{gem} = 15 Hz. Dies wird den Methylenprotonen 3-H_a und 3-H_e zugeordnet, die durch unterschiedliche chemische Umgebung nicht äquivalent sind. 3-H_e wird durch van-der-Waal-Wechselwirkungen mit H_C nur leicht tieffeldverschoben, während 3-H_a in den Anisotropiekegel der

Carbonylgruppierung fällt und stark tieffeldverschoben absorbiert (3-H_a: 3.17 ppm und 3-H_e: 2.51 ppm).

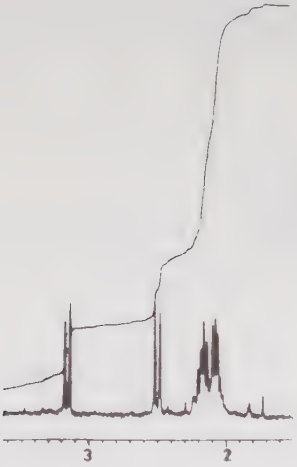


Abb.34: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Reaktionsproduktes aus Alonimid und NMN in D_2O/ D_2SO_4; Aliphatenteil

Abb.35: 90MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von Alonimid in Pyridin-d_5; Aliphatenteil

Die vier anderen Protonen im Aliphatenbereich absorbieren bei 2.16 und 2.06 ppm als Multipletts. Aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum kann nicht eindeutig auf die Existenz des 2,6-Piperidindionringes geschlossen werden. Aufgrund der gegebenen Synthesebedingungen (alkalisches Milieu) sollte eine Hydrolyse[51] des Piperidindionringes stattgefunden haben, die allerdings durch zwei Tripletts für die Methylengruppen bei geöffnetem Ring erkennbar sein müßte. Im 90MHz-^{1}H-NMR-Spektrum bilden die vier Protonen lediglich ein breites Singulett - im Gegensatz zur Reinsubstanz Alonimid (Abb.35) -, bei der keinerlei Fernkopplungen sichtbar sind. Erst im 400MHz-^{1}-H-NMR-Spektrum (Abb.34)

verbreitertes Singulett (m-Kopplung mit H_B nur andeutungsweise zu erkennen), H_B tritt bei 8.29 ppm als Doppeldublett in Resonanz ($^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz, $^4J_{H_B,H_A} \sim 1$ Hz) und H_C erscheint bei 7.88 ppm als Dublett ($^3J_{H_C,H_B}$ = 7 Hz). Die N-Methylgruppe zeigt sich bei 4.05 ppm.

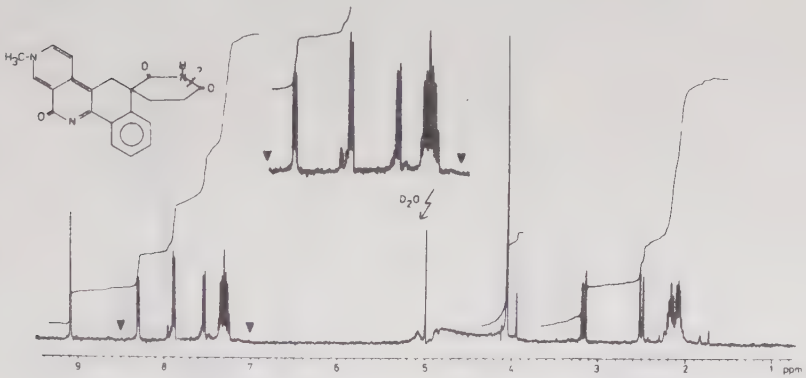


Abb.33: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Reaktionsproduktes aus Alonimid und NMN in D_2O/D_2SO_4

Weitere Signale im Aromatenbereich sind auf den Phenylteil des Alonimids zurückzuführen: bei tiefstem Feld erscheint 8-H (7.54 ppm), welches durch o-Kopplung mit 7-H zu einem Dublett aufgespalten wird ($^3J_{8\text{-H},7\text{-H}}$ = 7 Hz). Das Septett mit dreifacher Intensität bei 7.30 ppm entsteht durch Überlagerung der Signale für 5-H, 6-H und 7-H. Sie weisen geringe Verschiebungsdifferenzen und o-Kopplungen mit den benachbarten Protonen auf ($^3J \sim 7$ Hz).
Im Aliphatenbereich (Abb.34) erscheint bei 3.17 und 2.51 ppm ein AB-System mit J_{gem} = 15 Hz. Dies wird den Methylenprotonen 3-H_a und 3-H_e zugeordnet, die durch unterschiedliche chemische Umgebung nicht äquivalent sind. 3-H_e wird durch van-der-Waal-Wechselwirkungen mit H_C nur leicht tieffeldverschoben, während 3-H_a in den Anisotropiekegel der

Carbonylgruppierung fällt und stark tieffeldverschoben absorbiert (3-H_a: 3.17 ppm und 3-H_e: 2.51 ppm).

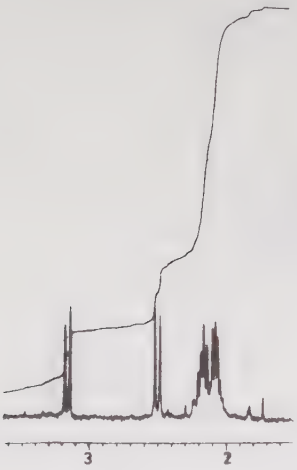


Abb.34: 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Reaktionsproduktes aus Alonimid und NMN in D_2O/ D_2SO_4; Aliphatenteil

Abb.35: 90MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von Alonimid in Pyridin-d_5; Aliphatenteil

Die vier anderen Protonen im Aliphatenbereich absorbieren bei 2.16 und 2.06 ppm als Multipletts. Aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum kann nicht eindeutig auf die Existenz des 2,6-Piperidindionringes geschlossen werden. Aufgrund der gegebenen Synthesebedingungen (alkalisches Milieu) sollte eine Hydrolyse[51] des Piperidindionringes stattgefunden haben, die allerdings durch zwei Tripletts für die Methylengruppen bei geöffnetem Ring erkennbar sein müßte. Im 90MHz-^{1}H-NMR-Spektrum bilden die vier Protonen lediglich ein breites Singulett - im Gegensatz zur Reinsubstanz Alonimid (Abb.35) -, bei der keinerlei Fernkopplungen sichtbar sind. Erst im 400MHz-^{1}-H-NMR-Spektrum (Abb.34)

erhält man zwei komplexe Signalstrukturen; diese dürften durch Überlagerungen von Resonanzen höherer Ordnungen beeinflußt sein.
Ein Vergleich des 90MHz-^{1}H-NMR-Spektrums von Glutethimid (Abb.36a) mit dessen Hydrolysat (Abb.36b), dem Monoamid der 4-Ethyl-4-phenylglutarsäure, bringt ebenfalls keine Klarheit.

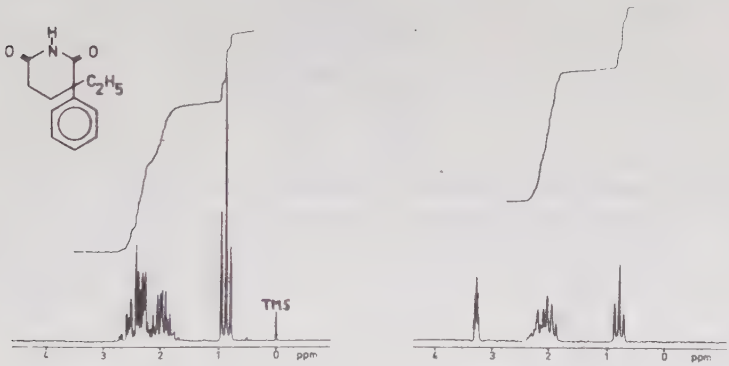
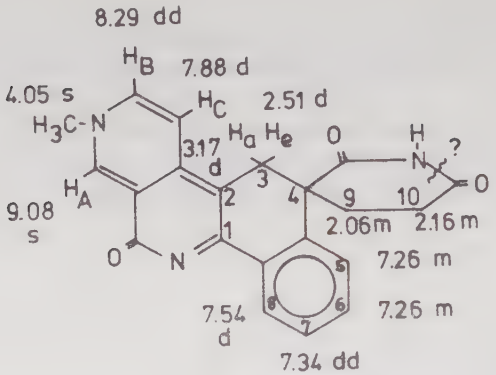


Abb.36: Aliphatenteil der 90MHz-^{1}H-NMR-Spektren von
a) Glutethimid in $CDCl_3$
b) Glutethimid-Hydrolysat in Methanol-d_4

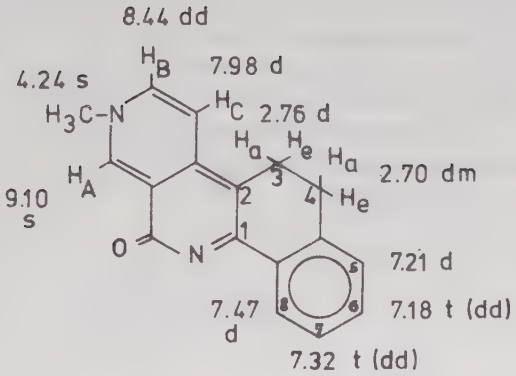
Hier fallen im Hydrolysat die Signale der Ethylgruppe mit den Methylenprotonen zusammen und lassen keine reinen Tripletts erkennen.
Auf weitere Untersuchungen wird verzichtet, da für die Fluoreszenz der Verbindung in erster Linie der Fluorophor des 2,7-Naphthyridinringes verantwortlich und dieser durch das ABM-System bereits identifiziert ist.



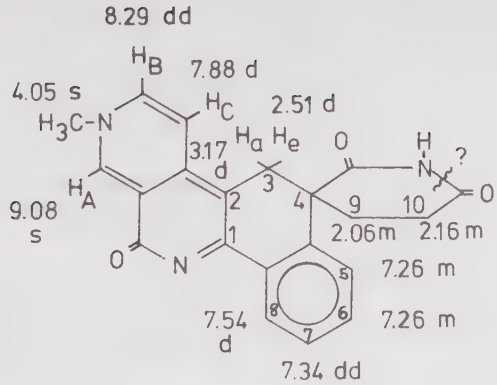
101

Tab.16: Zugeordnete Protonen im 400MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Reaktionsproduktes aus Alonimid und NMN (101)

ppm	Signal	Kopplungskonstanten	Integral	Zuordnung
9.08	s	-	1H	H_A
8.29	dd	$^3J_{H_B,H_C}$ = 7 Hz $^4J_{H_B,H_A}$ = 1 Hz	1H	H_B
7.88	d	$^3J_{H_C,H_B}$ = 7 Hz	1H	H_C
7.54	d	$^3J_{8\text{-}H,7\text{-}H}$ = 7 Hz	1H	8-H
(7.30):			3H	7-H, 6-H 5-H
7.34 7.26	dd m			
4.05	s		3H	N-CH_3
3.17	d	$^2J_{3\text{-}H_a,3\text{-}H_e}$ = 15 Hz	1H	3-H_a
2.51	d	$^2J_{3\text{-}H_c,3\text{-}H_a}$ = 15 Hz	1H	3-H_e
2.16	m		2H	10-H_2
2.06	m		2H	9-H_2


8.44 dd
4.24 s
7.98 d
2.76 d
2.70 dm
9.10 s
7.21 d
7.47 d
7.18 t (dd)
7.32 t (dd)

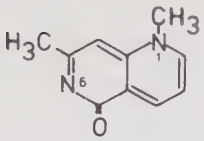
100


8.29 dd
4.05 s
7.88 d
2.51 d
3.17 d
9.08 s
2.06m
2.16 m
7.26 m
7.54 d
7.26 m
7.34 dd

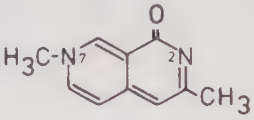
101

7. Zusammenfassung

Substanzen mit aktiven Methylengruppen lassen sich nach NAKAMURA und TAMURA mit N-1-Methylnicotinamidchlorid (NMN) fluorimetrisch nachweisen. Für das Endprodukt dieser Reaktion werden in der Literatur aufgrund der Umsetzung von NMN mit Aceton zwei Strukturisomere, ein 1,6- bzw. ein 2,7-Naphthyridinderivat, diskutiert.



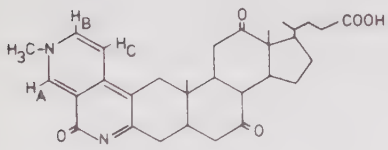
1,7-Dimethyl-5-oxo-1,5-dihydro-1,6-naphthyridin (2)



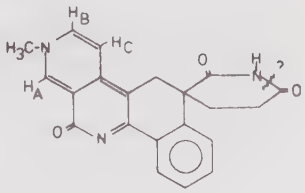
3,7-Dimethyl-1-oxo-1,7-dihydro-2,7-naphthyridin (6)

^{1}H- und ^{13}C-NMR-Untersuchungen des erneut synthetisierten Fluorophors zur Klärung dieser Fragestellung bewiesen endgültig das Vorliegen der 2,7-Naphthyridinverbindung. Anschließend wurde die Verwendung von NMN als Reagens auf etwa 90 Arzneistoffe mit aktiven Methylengruppen geprüft. Unter den gewählten Bedingungen lieferten als einzige das Choleretikum Dehydrocholsäure und das Sedativum Alonimid gute Ergebnisse. Linearität der Fluoreszenzreaktion herrscht im Bereich von 0,2 bis 2,5µg Dehydrocholsäure und 0,1 bis 1,5µg Alonimid je ml Reaktionslösung. Die Nachweisgrenzen betrugen 50 ng Dehydrocholsäure bzw. 2 ng Alonimid pro ml Reaktionslösung im Vergleich zu 10µg bzw. 85 ng pro ml Lösungsmittel bei der UV-Bestimmung. Die Berechnung der Variationskoeffizienten ergab Werte von 2,5% für Dehydrocholsäure (2,2µg/ml Reaktionslösung) und von 3,8% für Alonimid (1,3µg/ml Reaktionslösung).
Eine fluorimetrische Gehaltsbestimmung der Dehydrocholsäure

in Decholin^{R}-Tabletten wurde durchgeführt und mit den Ergebnissen aus der Ableitungsspektroskopie verglichen. Der F-Test bestätigte die Übereinstimmung beider Resultate. Die neue Methode ist spezifischer und weitaus empfindlicher, so daß geringe Substanzmengen ohne vorherige Extraktion nachgewiesen werden können.
Zur Strukturaufklärung der Fluoreszenzverbindung aus Dehydrocholsäure und NMN - Dehydrocholsäure besitzt vier theoretische Angriffspunkte für das Reagens - dienten einfachere Modellsubstanzen. Die Cyclohexanon- und 2-Decalon-NMN-Kondensationsprodukte wurden dargestellt und kernresonanzspektroskopisch charakterisiert. Im isolierten Dehydrocholsäure-NMN-Hauptprodukt fand die Reaktion jedoch entgegen dem erwarteten Ringschluß über C-4 der Dehydrocholsäure an C-2 statt. Als Modellverbindung für das Alonimid-NMN-Syntheseprodukt wurde α-Tetralon gewählt. Die Struktur der Alonimidfluoreszenzverbindung konnte weitgehend geklärt werden; die Möglichkeit einer Spaltung des Piperidindionringes wird diskutiert.



Dehydrocholsäure-NMN-Kondensationsprodukt (99)



Alonimid-NMN-Kondensationsprodukt (101)

In allen Verbindungen war das für die Fluoreszenz verantwortliche 2,7-Naphthyridingerüst durch das ABM-System in den 400MHz-^{1}H-NMR-Spektren zu identifizieren.

8. Experimenteller Teil

Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die gereinigten Substanzen. Die Schmelzpunkte der einzelnen Verbindungen wurden mit dem Kofler-Schmelzpunktmikroskop der Firma Reichelt ermittelt und unkorrigiert angegeben.

Die spektroskopischen Untersuchungen erfolgten mit den nachfolgend aufgeführten Geräten:

Elektronenspektroskopie: Beckman Spektralphotometer Modell 24 zur Messung wurden 10 mm Quarzküvetten verwendet; die Lösungsmittel sind jeweils angegeben.

UV-VIS-Derivativspektroskopie: Beckman Spektralphotometer Modell 24 mit dem Derivativzusatzgerät, 1.Ableitung (d^1A), Empfindlichkeit 30

Infrarotspektroskopie: Beckman Acculab V, sowie Beckman IR-4250. Die Spektrenaufnahme erfolgte in KBr-Preßlingen.

Fluoreszenzspektroskopie: Spektralphotometer PMQ II mit Fluoreszenzansatz ZFM 4 "Zeiss", Quecksilberlampe ST 41, sowie Spektralphotometer der Firma Zeiss mit zwei Doppelmonochromatoren MM 12, Xenonhochdrucklampe XBO 450 W, Photomultiplier RCA 7265, y-t-Schreiber der Firma Metrawatt.

Die Geräteeinstellung erfolgte mit dem Fluoreszenzstandard F_{53} bei 600 nm auf 100 SkT bzw. 10 S.E. bei 1) 365 nm/1,0 mm und 2) 530 nm/0,1 mm, dabei bedeutet:

1) Einstellung des Anregungsmonochromators Wellenlänge/Spalt
2) Einstellung des Emissionsmonochromators Wellenlänge/Spalt.

Kernresonanzspektroskopie:

80MHz-^{1}H-Spektren: Bruker WP 80, Meßtemperatur 28°, Spektrenbreite 1250 Hz. Interner Standard war TMS bzw. das Signal des jeweils verwendeten Lösungsmittels.

20.115MHz-^{13}C-Spektren: Bruker WP 80, Meßtemperatur 28°, Spektrenbreite 5000 Hz. Interner Standard war TMS bzw. das Signal des jeweils verwendeten Lösungsmittels.

Die Steuerung des Kernresonanzspektrometers WP 80, die Spektrenakkumulation und Fourier-Transformation erfolgte mit der Computereinheit Bruker BNC 28.

90MHz-^{1}H-Spektren: Bruker HFX 90 mit Datensystem Aspect 2000, Meßtemperatur 28°.

400MHz-^{1}H-Spektren: Bruker WM 400 mit Datensystem Aspect 2000, Meßtemperatur 28°.

Massenspektrometrie: Massenspektrometer Kratos MS 50 mit Datensystem DS 50 Kratos 70 eV, Direkteinlaß 180°.

Präparative Säulenchromatographie:

Lobar-Säule Größe B, LiChroprep RP 8 (40 - 63µm), Merck Art.Nr.11804 Differentialrefraktometer LCD 201 der Firma Melz.

Screening-Fluoreszenztest

Ca. 20 mg Substanz werden mit 0,1 ml 1,5 N-NaOH und 0,1 ml 10 mmol N-1-Methylnicotinamidchlorid (NMN) in 10^{-4} N-HCl gemischt. Es entstehen violette, blaue oder grüne Fluoreszenzen. Auf Zusatz von 0,5 ml 88%ige Ameisensäure bleibt bei reaktiven Substanzen die Fluoreszenz erhalten, bei der Blindprobe und inaktiven Verbindungen verschwindet sie dagegen meist völlig.

Nachweis auf aktive Methylengruppen

Zu der zu testenden Substanz gibt man 1,3-Dinitrobenzol und einige Tropfen 0,5 N ethanolische Kalilauge. Es tritt bei positiver Reaktion eine Violett- bzw. Rotfärbung auf.

Fluoreszenzreaktion nach H.NAKAMURA und Z.TAMURA[9)]

Zu 100µl der wäßrigen (ethanolischen) Probelösung werden 100µl 6 M Natronlauge gegeben. Die Mischung wird mit 100µl 50 mmol NMN in 10^{-4} M-HCl unter kräftigem Schütteln auf einem Vortex-Mixer versetzt. Nach 10 min. wird die alkalische Lösung durch Zugabe von 1500µl 18,66 M Ameisensäure angesäuert. Alle bis hierher beschriebenen Schritte werden unter Kühlung in einem Eisbad (0°) durchgeführt. Die saure Lösung wird 3 min. auf 92° erhitzt und im Eisbad auf 0° abgekühlt. Die Fluoreszenzintensität wird bei der jeweiligen Anregungs- und Emissionswellenlänge gegen einen Vergleich ohne Carbonylkomponente gemessen.

Synthese von N-1-Methylnicotinamidchlorid nach P.GIRKIS-TAKLA und I.CHRONEOS[29)]

9 g Nicotinamid werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und 10 ml Methyliodid zugegeben. Die Mischung wird - am besten über Nacht - stehen gelassen, das Produkt abfiltriert, mit etwa 50 ml Dimethylformamid gewaschen und an der Luft getrocknet.
Schmelzpunkt 205-208°
Ausbeute 67% d.Th.

Synthese des Kondensationsproduktes von NMN mit Aceton 6
nach HUFF[10)]

Da das Iodidsalz des N-1-Methylnicotinamids einfacher zugänglich war, wurde dieses mit Aceton nach HUFF umgesetzt. Das Endprodukt ließ sich jedoch schlecht auskristallisieren und war nicht dc-einheitlich (Abb.37).

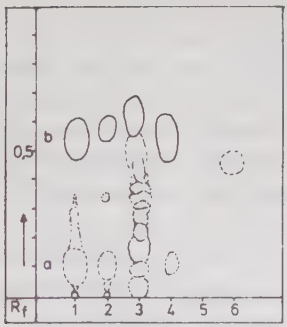


Abb.37: DC: Reaktionsansatz 6
FM: n-Butanol/Essigsäure/Wasser
5 : 2,5 : 2,5
1. Rohprodukt der Synthese
2. in Ethanol umkristallisiert
3. eingeengte Mutterlauge
4. NMN-iodid
5. Methyliodid
6. Nicotinsäureamid

a) Fluoreszenzprodukt blaue Fluoreszenz bei 366 nm
b) gelbes Fluoreszenzprodukt aus NMN-iodid

Nach mehreren Ansätzen wurde schließlich von N-1-Methylnicotinamidchlorid ausgegangen, welches man durch Schütteln des Iodidsalzes mit frisch gefälltem Silberchlorid gewinnen konnte. Das so entstandene Fluoreszenzprodukt kristallisierte leicht aus und gab nach Umkristallisieren aus Ethanol ein einheitliches DC (Abb.38).

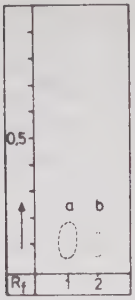


Abb.38: DC: Syntheseprodukt 6

FM: n-Butanol/Essigsäure/Wasser
5 : 2,5 : 2,5

1. gereinigtes Syntheseprodukt, Rf = 0,13
2. N-1-Methylnicotinamidchlorid

a) blaue Fluoreszenz bei 366 nm
b) Fluoreszenzlöschung bei 366 nm

Zu 2,5 g (15 mmol) N-1-Methylnicotinamidchlorid, gelöst in 130 ml einer Mischung aus gleichen Teilen Wasser und Aceton (über Kaliumpermanganat destilliert), werden 8 ml 0,7 N-KOH unter Rühren gegeben. Die Mischung bleibt 12 h bei Raumtemperatur stehen. Die Lösung erwärmt sich leicht und färbt sich auf Zugabe der Lauge tief orange. Nach 12 h werden 15 ml cc. Salzsäure zugefügt; der Kolben wird mit einem Glastrichter bedeckt und in einem kochenden Wasserbad 20 min. erhitzt. Die Lösung wird im Vakuum bis fast zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in ein schmales Becherglas gegeben, mit absolutem Ethanol gerade bedeckt und eine Stunde bei etwa 50° unter gelegentlichem Rühren aufbewahrt. Ein Verlust an absolutem Ethanol wird ausgeglichen und die Mischung 24 h bei -20° gehalten. Die halbfeste Masse wird auf einem Büchner Trichter filtriert; nach mehrmaligem Waschen mit kaltem (-10°) absolutem Ethanol bleiben auf dem Filter etwa 6,1 g eines hellgelben kristallinen Materials, welches aus Kaliumchlorid und Kondensationsprodukt besteht. Die dunkelbraune Mutterlauge ergibt nach dem Evakuieren ein tiefdunkel, fluoreszierendes Öl, das sich nicht auskristallisieren läßt. Das Salzgemisch wird zur einfacheren Abtrennung des Kaliumchlorids im Soxhlet mit absolutem Ethanol extrahiert und das Kondensationsprodukt als Hydrochlorid aus Wasser/Aceton umkristallisiert.
Schmelzpunkt: 305° (beginnende Zersetzung)
Ausbeute: 0,93 g/ 29,4% d.Th.

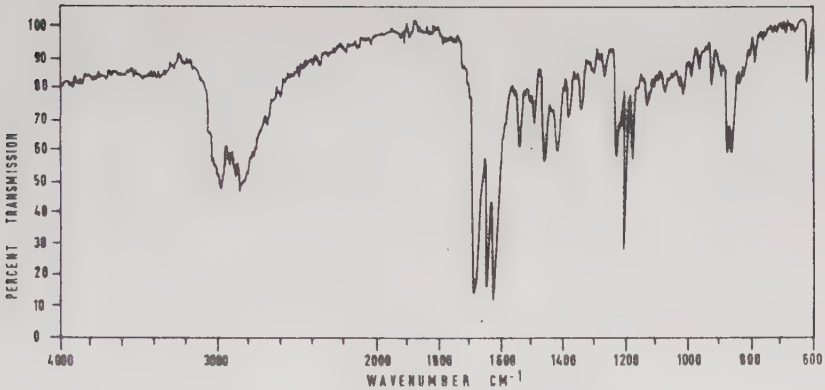


Abb.39: IR-Spektrum des Kondensationsproduktes aus NMN und Aceton als Hydrochlorid in KBr (6)

Das IR-Spektrum des Kondensationsproduktes aus NMN und Aceton (Abb.39) zeigt im Bereich von 3200 bis 2800 cm^{-1} Absorptionen der symmetrischen und asymmetrischen CH_2/CH_3-Valenzschwingungen. Zwischen 2820 und 2780 cm^{-1} (2800 cm^{-1}) erkennt man die Valenzschwingung der $N-CH_3$-Gruppe. Da die Verbindung als Hydrochlorid vorliegt, kann man die schwachen Banden bei 2690 und 2660 cm^{-1} der -N-H-Valenzschwingung zuordnen. Die starke Resonanz der Carbonylgruppe liegt bei 1675 cm^{-1}. Zwei weitere starke Banden bei 1620 cm^{-1} und 1635 cm^{-1} resultieren aus der Absorption der Amidgruppe und der C=C-Doppelbindung in Konjugation zur C=O-Gruppe. Die symmetrischen und asymmetrischen Deformationsschwingungen der CH_2/CH_3-Gruppen liegen zwischen 1400 und 1300 cm^{-1}.

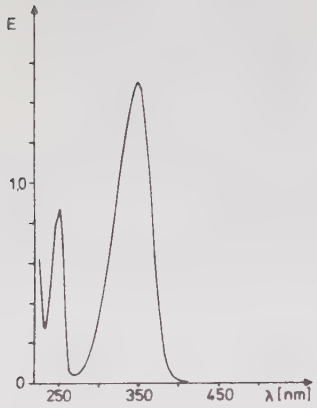


Abb.40: UV-Spektrum des Kondensationsproduktes als Hydrochlorid in Wasser gegen Wasser 6

Die Absorptionsmaxima des Elektronenspektrums (Abb.40) liegen bei 348 nm (Hauptmaximum), 252 nm und eine Schulter bei 245 nm. Der $E^{1\%}_{1cm}$ beträgt etwa 620 und ε etwa 12-13 000 (λ 348 nm).
Das Fluoreszenzemissionsmaximum der Verbindung bei 432 nm konnte durch ein Fluoreszenzspektrum (Abb.41) bestätigt werden.

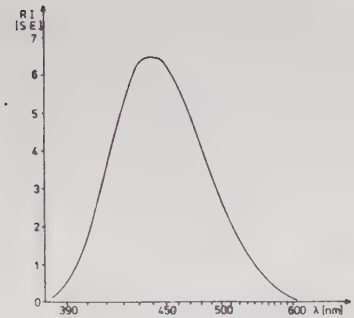


Abb.41: Fluoreszenzemissionsspektrum des Kondensationsproduktes aus NMN und Aceton als Hydrochlorid in Wasser, Anregungswellenlänge 365 nm

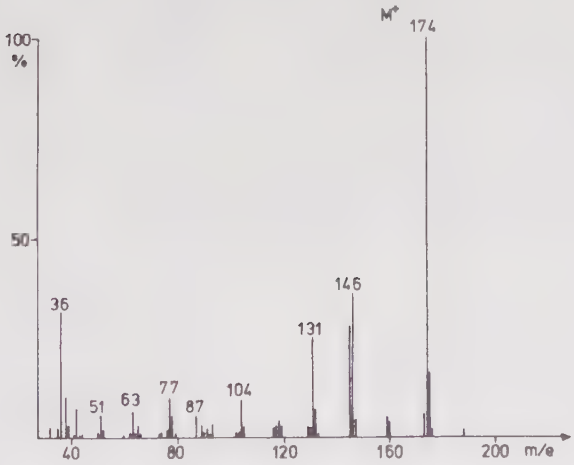


Abb.42: Massenspektrum des Syntheseproduktes 6

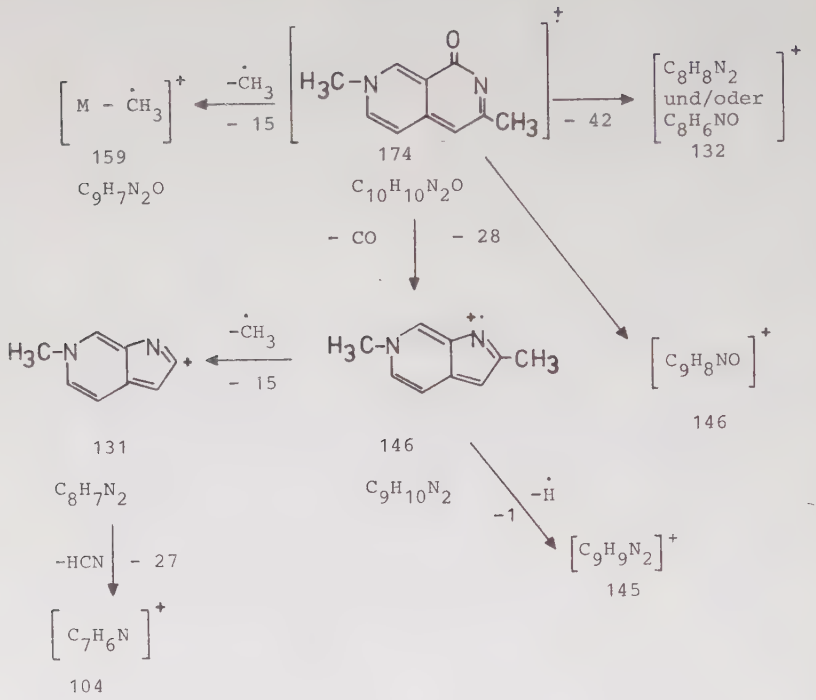


Abb.43: Zerfallsschema der Verbindung 6

Tab.17: Fragmentzuordnung von 6 , MG 210,66 g

m/e	%	Elementar-analyse	M-x	Zuordnung
188	1.9	$C_{11}H_{12}N_2O$		
175	16,5	$C_{10}H_{11}N_2O$		
174	100	$C_{10}H_{10}N_2O$	M^+	Molekülion der freien Base, base peak
160	3,9	$C_9H_8N_2O$		
159	5,4	$C_9H_7N_2O$	M - 15	- Methylradikal
146	36,3	$C_9H_{10}N_2$	M - 28	- Kohlenmonoxid
146	1,6	C_9H_8NO		
145	27,8	$C_9H_9N_2$	M - 29	M - 28 -1
132	2,8	$C_8H_8N_2$	M - 42	
132	7,3	C_8H_6NO		
131	25,2	$C_8H_7N_2$	M - 43	M - 28 - 15
104	9,6	C_7H_6N	M - 70	M - 28 - 15 - 27
77	10,0	C_6H_5		
63	6,5	C_5H_3		
51	5,7	C_4H_3		
42	7,4	C_2H_4		
38	10,4	$H^{37}Cl$	Isotopenverhältnis 1 : 3	
36	31,7	$H^{35}Cl$		

zu Abb.8a

Tab.18: Werte zu den Eichgeraden für wiederholte Messungen derselben Dehydrocholsäure-konzentrationsreihe; Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten und Geradengleichung

µg/ml Reaktionslösung	0	0,222	0,444	0,667	0,889	1,111	1,333	1,556	1,778	2,000	2,222	Meßreihe
R.I.	0	0,40	0,60	0,90	1,15	1,45	1,80	2,05	2,30	2,55	2,85	1
[S.E.]	0	0,35	0,60	0,85	1,15	1,40	1,70	1,90	2,20	2,40	2,70	2
	0	0,40	0,65	0,90	1,20	1,50	1,70	2,00	2,25	2,50	2,80	3
$\bar{x}$	0	0,38	0,62	0,88	1,17	1,45	1,73	1,98	2,25	2,48	2,78	y= 0,07+1,23x
s	0	0,029	0,029	0,029	0,029	0,050	0,058	0,076	0,050	0,076	0,076	r= 0,9994
VK%	0	7,60	4,66	3,28	2,47	3,45	3,34	3,86	2,22	3,08	2,78	

zu Abb.8b

Tab.19: Werte zu den Eichgeraden für Messungen verschiedener Dehydrocholsäurekonzentrationsreihen am selben Tag; Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten und Geradengleichung

µg/ml Reaktionslösung	0	0,222	0,444	0,667	0,889	1,111	1,333	1,556	1,778	2,000	2,222	Meßreihe
R.I.	0	0,35	0,60	0,85	1,10	1,40	1,60	1,90	2,10	2,25	2,45	1
[S.E.]	0	0,40	0,60	0,90	1,15	1,40	1,70	1,90	2,10	2,20	2,40	2
	0	0,35	0,60	0,85	1,10	1,35	1,60	1,85	2,00	2,20	2,45	3
	0	0,35	0,60	0,85	1,10	1,35	1,60	1,80	2,05	2,25	2,45	4
	0	0,35	0,60	0,85	1,15	1,30	1,60	1,85	2,10	2,20	2,50	5
	0	0,30	0,55	0,85	1,15	1,30	1,60	1,80	2,05	2,35	2,55	6
	0	0,35	0,60	0,80	1,10	1,40	1,65	1,90	2,15	2,35	2,55	7
	0	0,40	0,60	0,85	1,10	1,35	1,60	1,85	2,10	2,35	2,50	8
	0	0,30	0,55	0,85	1,10	1,30	1,65	1,80	2,00	2,35	2,55	9
	0	0,35	0,60	0,90	1,20	1,35	1,65	1,85	2,10	2,40	2,60	10
$\bar{x}$	0	0,35	0,59	0,86	1,13	1,35	1,63	1,85	2,08	2,29	2,50	y= 0,09+1,11x
s	0	0,033	0,021	0,028	0,035	0,041	0,035	0,041	0,049	0,078	0,062	r= 0,9985
VK%	0	9,52	3,57	3,32	3,14	3,02	2,18	2,21	2,34	3,38	2,49	

zu Abb.8c

Tab.20: Werte zu den Eichgeraden für Messungen verschiedener Dehydrocholsäurekonzentrationsreihen an verschiedenen Tagen; Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten und Geradengleichung

µg/ml Reaktionslösung	0	0,222	0,444	0,667	0,889	1,111	1,333	1,556	1,778	2,000	2,222	Meßreihe
R.I. [S.E.]	0	0,23	0,50	0,67	0,96	1,15	1,33	1,50	1,62	1,85	2,00	1.Tag
	0	0,40	0,60	0,85	1,15	1,40	1,60	1,90	2,15	2,35	2,60	2.Tag
	0	0,41	0,61	0,88	1,18	1,45	1,71	1,96	2,23	2,45	2,73	3.Tag
	0	0,30	0,48	0,75	0,95	1,20	1,35	1,55	1,78	1,95	2,20	4.Tag
	0	0,36	0,60	0,86	1,15	1,43	1,71	1,96	2,23	2,46	2,75	5.Tag
	0	0,40	0,65	0,95	1,20	1,40	1,70	1,90	2,05	2,25	2,50	6.Tag
$\bar{x}$	0	0,35	0,57	0,83	1,10	1,34	1,57	1,80	2,01	2,22	2,46	y= 0,09+1,08x
s	0	0,072	0,072	0,100	0,113	0,129	0,181	0,211	0,254	0,260	0,302	r= 0,9986
VK%	0	20,44	11,83	12,06	10,24	9,62	10,50	11,75	12,65	11,71	12,29	

zu Abb.9

Tab.21: Werte zu den UV-Eichgeraden der Dehydrocholsäure; Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten, Geradengleichungen (285 nm)

Meßreihe	mg/ml	0	0,667	1,337	2,000	2,667	3,333	4,000	a b r
1	E	0	0,175	0,334	0,501	0,657	0,829	0,987	y= 0,01 + 0,25x r= 0,9999
2		0	0,173	0,333	0,499	0,664	0,836	0,997	y= 0,25x r= 1,0000
3		0	0,166	0,335	0,503	0,666	0,840	0,999	y= 0,25x r= 1,0000
4		0	0,178	0,343	0,509	0,672	0,841	0,999	y= 0,01 + 0,25x r= 0,9999
5		0	0,164	0,329	0,492	0,656	0,825	0,978	y= 0,25x r= 1,0000
6		0	0,164	0,327	0,488	0,654	0,823	0,980	y= 0,25x r= 1,0000
7		0	0,167	0,332	0,500	0,669	0,842	1,001	y= 0,25x r= 1,0000
8		0	0,164	0,334	0,502	0,670	0,846	1,009	y= 0,25x r= 1,0000
9		0	0,159	0,323	0,484	0,651	0,818	0,977	y= 0,25x r= 1,0000
10		0	0,161	0,325	0,493	0,658	0,826	0,985	y= 0,25x r= 1,0000
$\bar{x}$		0	0,167	0,332	0,497	0,662	0,833	0,991	y= 0,25x r= 1,0000
s		0	0,006	0,006	0,008	0,007	0,010	0,011	
VK%		0	3,6	1,7	1,5	1,1	1,2	1,1	

zu 5.1.5

Probenvorbereitung

1 Tablette Decholin^{R} wird in einem 100 ml Meßkolben mit ca. 50 ml 0,1 N-NaOH gegeben, 30 min. stehen gelassen und anschließend mit 0,1 N-NaOH auf 100 ml aufgefüllt. Die nicht in der Lauge gelösten Bestandteile werden abzentrifugiert. Die Lösung wird noch zweimal im Verhältnis 1 : 10 auf $6{,}21 \cdot 10^{-5}$ molar mit 0,1 N-NaOH verdünnt. 100µl der Probenlösung werden in die Fluoreszenzreaktion eingesetzt; daraus resultiert eine theoretische Konzentration der Dehydrocholsäure von 1,39µg/ml.

Erstellen der Eichgeraden

40,25 mg Dehydrocholsäure werden in 10 ml 0,1 N-NaOH gelöst (10^{-2} molar). Durch zweimaliges Verdünnen im Verhältnis 1 : 10 erhält man eine 10^{-4} molare Lösung. Diese wird nochmals auf 10^{-5}; $2{,}5 \cdot 10^{-5}$; $5{,}0 \cdot 10^{-5}$; $7{,}5 \cdot 10^{-5}$ molar verdünnt. Mit jeweils 100µl wird die Fluoreszenzreaktion durchgeführt. Die Konzentrationen bezogen auf das Endvolumen von 1 800µl sind der übersichthalber in Tabelle 22 aufgeführt.

Tab.22: Dehydrocholsäurekonzentrationen der Reaktionslösung

Dehydrocholsäure in 0,1 N-NaOH	Reaktionslösung 1 800 µl	
10^{-4} molar	$5{,}6 \cdot 10^{-6}$ molar	2,24 µg/ml
$7{,}5 \cdot 10^{-5}$ molar	$4{,}2 \cdot 10^{-6}$ molar	1,68 µg/ml
$5{,}0 \cdot 10^{-5}$ molar	$2{,}8 \cdot 10^{-6}$ molar	1,12 µg/ml
$2{,}5 \cdot 10^{-5}$ molar	$1{,}4 \cdot 10^{-6}$ molar	0,56 µg/ml
10^{-5} molar	$5{,}6 \cdot 10^{-7}$ molar	0,22 µg/ml

Meßbedingungen: Multiplier 1800 V, Schreiber 5 mV, Verstärkung $3 \cdot 10^{-8}$ A, λ_{Ec} 360 nm/Spalt 1,0 mm, $\lambda_{Em.}$ 445 nm/Spalt 0,15 mm

Die Geradengleichung lautet $y = 0{,}07 + 3{,}12x$ mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0{,}9996$.

Tab.23: Berechnung der Standardabweichung für fünf Decholin^{R}-Tabletten nach der Fluoreszenzmethode

Dehydrocholsäurekonzentration in µg/ml Reaktionslösung	Tablette Nr. 1	2	3	4	5
	1,42	1,42	1,33	1,33	1,39
	1,43	1,41	1,31	1,35	1,40
	1,45	1,41	1,37	1,35	1,40
	1,44	1,41	1,34	1,36	1,41
	1,44	1,41	1,37	1,36	1,40
	1,44	1,43	1,33	1,39	1,44
	1,44	1,40	1,32	1,41	1,46
	1,43	1,41	1,31	1,39	1,47
	1,41	1,42	1,33	1,38	1,49
	1,42	1,39	1,34	1,39	1,50
$\bar{x}$	1,43	1,41	1,33	1,37	1,44
s	0,014	0,011	0,021	0,025	0,041
VK%	0,96	0,78	1,59	1,80	2,88

zu Abb.16a

Tab.24: Werte zu den Eichgeraden für wiederholte Fluoreszenzmessungen derselben Alonimid-konzentrationsreihe; Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten und Geradengleichung; $\lambda_{Ec.}$ 410 nm/1,0 mm Spalt und $\lambda_{Em.}$ 460 nm/ 0,0075 mm Spalt

µg/ml Reaktions-lösung	0	0,133	0,267	0,400	0,533	0,667	0,800	0,933	1,066	1,200	1,333	Meß-reihe
R.I.	0	0,87	1,58	2,38	3,03	3,79	4,46	5,15	5,84	6,70	7,28	1
[S.E.]	0	0,90	1,65	2,37	3,05	3,73	4,47	5,04	5,77	6,75	7,30	2
	0	0,88	1,60	2,34	3,04	3,75	4,43	5,11	5,82	6,72	7,25	3
$\bar{x}$	0	0,88	1,61	2,36	3,04	3,76	4,45	5,10	5,81	6,72	7,28	y=0,13+5,40x
s	0	0,015	0,036	0,021	0,010	0,031	0,021	0,056	0,036	0,025	0,025	r= 0,9996
VK%	0	1,70	2,24	0,89	0,33	0,82	0,47	1,09	0,62	0,37	0,34	

zu Abb.16b

Tab.25: Werte zu den Eichgeraden für Messungen verschiedener Alonimkonzentrationsreihen am selben Tag; Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten und Geradengleichung; $\lambda_{Ec.}$ 410 nm/1,0 mm Spalt und $\lambda_{Em.}$ 460 nm/0,0075 mm Spalt

µg/ml Reaktionslösung	0	0,133	0,267	0,400	0,533	0,667	0,800	0,933	1,066	1,200	1,333	Meßreihe
R.I	0	0,80	1,39	2,19	2,92	3,51	4,10	4,83	5,57	6,47	7,15	1
[S.E.]	0	0,91	1,62	2,35	3,13	3,98	4,77	5,45	6,07	6,70	7,52	2
	0	0,94	1,83	2,67	3,21	4,36	5,16	5,86	6,56	7,38	8,06	3
	0	0,84	1,70	2,47	3,18	4,10	5,02	5,87	6,25	7,20	7,90	4
	0	0,88	1,60	2,36	3,02	3,85	4,53	5,21	5,89	6,67	7,44	5
	0	0,92	1,73	2,54	3,28	4,06	4,81	5,61	6,39	7,18	7,99	6
	0	0,88	1,61	2,33	3,05	3,91	4,66	5,40	6,23	7,07	7,82	7
	0	0,85	1,59	2,43	3,08	3,89	4,71	5,34	6,07	6,73	7,51	8
	0	1,00	1,61	2,28	3,03	3,90	4,59	5,21	5,80	6,71	7,39	9
	0	0,98	1,72	2,38	3,19	3,84	4,45	5,22	6,01	6,79	7,60	10
$\bar{x}$	0	0,90	1,64	2,40	3,11	3,95	4,68	5,40	6,08	6,89	7,64	y= 0,11 +5,66x
s	0	0,063	0,117	0,136	0,108	0,228	0,297	0,318	0,290	0,295	0,293	r= 0,9998
VK%	0	7,00	7,13	5,67	3,47	5,77	6,34	5,89	4,77	4,28	3,83	

zu Abb.16c

Tab.26: Werte zu den Eichgeraden für Messungen verschiedener Alonimidkonzentrationsreihen an verschiedenen Tagen; Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten und Geradengleichung; $\lambda_{Ec.}$ 410 nm/1,0 mm Spalt und $\lambda_{Em.}$ 460 nm/0,0075 Spalt

µg/ml Reaktionslösung	0	0,133	0,267	0,400	0,533	0,667	0,800	0,933	1,066	1,200	1,333	Meßreihe
R.I.	0	0,69	1,39	2,00	2,75	3,47	4,10	4,74	5,34	5,89	6,60	1.Tag
[S.E.]	0	1,05	2,16	3,15	4,09	5,21	6,19	7,05	8,13	8,99	10,04	2.Tag
	0	0,97	2,12	3,20	4,17	5,29	6,30	7,12	8,21	8,92	9,77	3.Tag
	0	0,99	2,02	3,00	3,85	4,99	5,97	6,87	7,60	8,40	9,32	4.Tag
	0	0,77	1,68	2,29	3,00	3,69	4,29	4,93	5,77	6,43	7,18	5.Tag
	0	1,07	2,03	3,08	4,11	5,16	6,03	7,14	8,20	9,02	9,99	6.Tag
$\bar{x}$	0	0,92	1,90	2,79	3,66	4,64	5,84	6,31	7,21	7,94	8,82	y= 0,12+6,64x
s	0	0,156	0,30	0,510	0,624	0,826	1,004	1,147	1,308	1,409	1,525	r= 0,9986
VK%	0	16,96	15,79	18,28	17,05	17,80	18,32	18,18	18,14	17,75	17,29	

zu Abb.18

Tab.27: Werte zu den UV-Eichgeraden des Alonimid; Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten, Geradengleichungen (247 nm)

Meßreihe	µg/ml	0	3,33	6,67	10,00	13,33	16,67	20,00	a	b	r
1	E	0	0,179	0,347	0,495	0,668	0,823	0,983	y= 0,01 +	0,05x	r= 0,9998
2		0	0,156	0,318	0,485	0,649	0,807	0,963	y=	0,05x	r= 0,9999
3		0	0,163	0,315	0,492	0,653	0,813	0,969	y=	0,05x	r= 0,9999
4		0	0,164	0,333	0,490	0,664	0,827	0,989	y=	0,05x	r= 1,0000
5		0	0,164	0,333	0,500	0,671	0,837	1,006	y=	0,05x	r= 1,0000
6		0	0,157	0,320	0,478	0,646	0,810	0,959	y=	0,05x	r= 0,9999
7		0	0,160	0,323	0,484	0,647	0,810	0,986	y=	0,05x	r= 1,0000
8		0	0,154	0,313	0,474	0,649	0,814	0,950	y=	0,05x	r= 0,9997
9		0	0,154	0,314	0,466	0,640	0,819	0,950	y=	0,05x	r= 0,9996
10		0	0,152	0,312	0,468	0,642	0,817	0,951	y=	0,05x	r= 0,9997
	$\bar{x}$	0	0,160	0,323	0,483	0,653	0,818	0,969	y=	0,05x	r= 0,9999
	s	0	0,008	0,011	0,012	0,011	0,009	0,019			
	VK%	0	5,0	3,4	2,5	1,7	1,1	1,9			

Synthese von 3*H*,5*H*-3-Methyl-5-oxo-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[c][2,7]-naphthyridin (97)

Die Synthese des Fluoreszenzproduktes aus Cyclohexanon und NMN wird analog der Arbeitsvorschrift von HUFF[10] durchgeführt. 1,25 g (7,5 mmol) NMN werden in einer Mischung aus 10 ml Ethanol 70% und 5 ml Wasser gelöst und mit 54,0 g (0,55 mmol) Cyclohexanon versetzt. Es bilden sich zwei Phasen, da sich nur ein geringer Teil des Cyclohexanons im Alkohol löst. Unter kräftigem Rühren werden 4 ml 7 N-KOH zugetropft. Eine Verfärbung nach tiefdunkelbraun tritt ein. Die Reaktionslösung bleibt 12 h bei Raumtemperatur stehen. Sie wird anschließend mit 7,5 ml konz. HCl versetzt und im Wasserstrahlvakuum eingeengt, um überschüssige Säure und die Hauptmenge nicht umgesetzten Cyclohexanons zu entfernen. Das Syntheseprodukt wird mit etwa 50 ml Wasser versetzt und der unlösliche braune Bestandteil in Dichlormethan ausgenommen. Nach Trennung und Untersuchung der beiden Phasen wird der organische Teil verworfen; zu der Wasserphase, die das interessierende Produkt enthält, wird 25%iger Ammoniak gegeben, so daß eine Lösung mit etwa 1% Ammoniak entsteht. Die Isolierung des Fluoreszenzproduktes erfolgt über eine Lobar-Säule Größe B, gefüllt mit LiChroprep RP 8 40 - 63µm. Als Fließmittel dient eine Mischung aus Wasser/Methanol/Ammoniak 25% im Verhältnis 41/55/4.
Die gesammelten Fraktionen (Abb.44) werden am Rotationsverdampfer bei 55° Badtemperatur unter Vakuum eingeengt; an der Kolbenwand bleibt ein gelbbraunes Öl zurück.
Schmelzpunkt: 189° (beginnende Zersetzung)
Ausbeute: 0,29 g/15,6 d.Th.

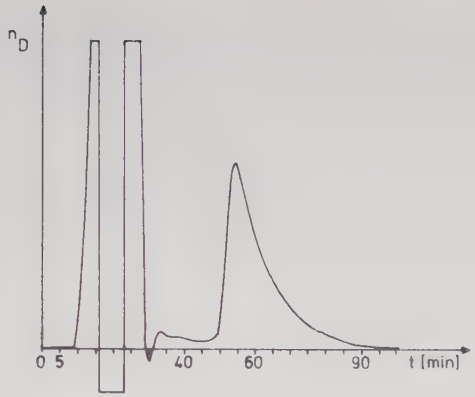


Abb.44: Chromatogramm der präparativen Säulentrennung von 97 über eine Lobar-Säule Gr.B, gefüllt mit LiChroprep RP 8 40-63 µm; Elutionsmittel Wasser/Methanol/ Ammoniak 25% im Verhältnis 41/55/4

Das IR-Spektrum (Abb.45) von 97 zeigt die charakteristischen Banden des bereits bekannten Acetonfluoreszenzproduktes 6. Zwischen 3070 und 3040 cm^{-1} treten die ungesättigten C-H-Valenzschwingungen und im Bereich von 2980 bis 2860 cm^{-1} die symmetrischen und asymmetrischen CH_2/CH_3-Valenzschwingungen auf. Die Absorptionsbande bei 2800-2790 cm^{-1} wird der $N-CH_3$-Valenzschwingung zugeordnet. Die starke Bande bei 1670 cm^{-1} rührt von der C=O-Valenzschwingung her. Die beiden Resonanzen bei 1635 und 1600 cm^{-1} gehören zur Amidstruktur und zur C=C-Doppelbindung, welche in Konjugation zur C=O-Funktion steht. Im Bereich von 1480 bis 1440 cm^{-1} erscheinen die CH_2/CH_3-Deformationsschwingungen.

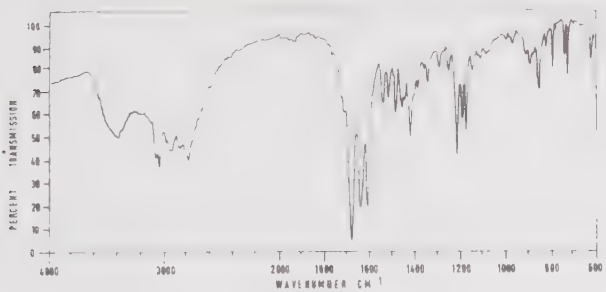


Abb.45: IR-Spektrum des Kondensationsproduktes aus Cyclohexanon und N-1-Methylnicotinamidchlorid in KBr(97)

Das Elektronenspektrum (Abb.46) des isolierten Hauptproduktes aus Cyclohexanon und N-1-Methylnicotinamidchlorid in Wasser weist eine Bande bei 363 nm und eine weitere, schwächere mit einer Schulter bei 255 nm auf.

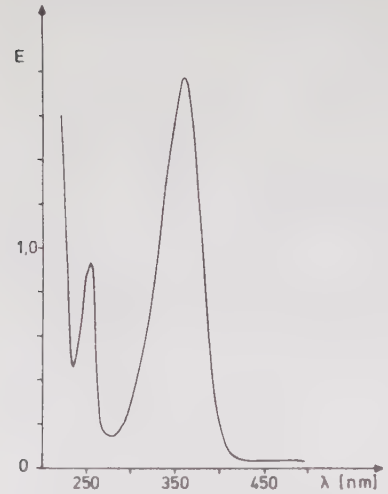


Abb.46: Elektronenspektrum von 97 in Wasser

Das Fluoreszenzspektrum dieser Verbindung in 0,01 N-HCl besitzt bei 372 nm ein Anregungs- und bei 470 nm ein Emissionsmaximum (Abb.47).

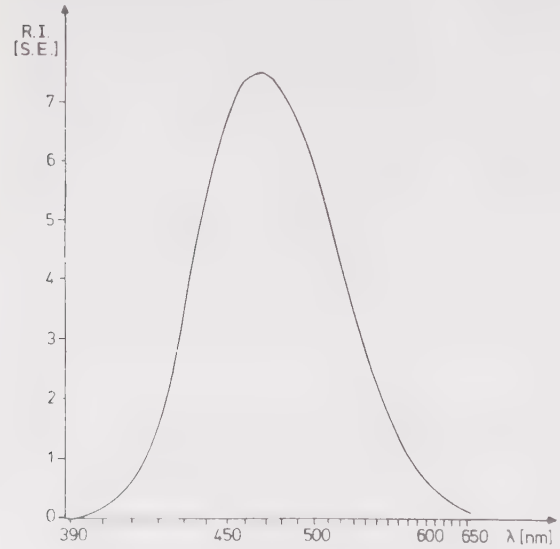


Abb.47: Emissionsspektrum von 97 in 0,01 N-HCl

Synthese von 3*H*,5*H*-3-Methyl-5-oxo-7,8,9,10,11,12-hexahydro-naphtho [2,1-c][2,7]-naphthyridin (98)

Zu 1,25 g (7,5 mmol) NMN, gelöst in etwa 5 ml Wasser, und 1,15 g (7,5 mmol) 2-Decalon werden 4 ml 7 N-KOH unter ständigem Rühren zugetropft. Die wäßrige Phase verfärbt sich dabei über gelb nach tiefrotbraun. Der Reaktionsansatz steht 12 h bei Raumtemperatur und wird mit konz. HCl angesäuert. Die wäßrige Phase wird im Scheidetrichter von der organischen abgetrennt und mehrmals mit Dichlormethan ausgeschüttelt, um dort nicht umgesetztes, gelöstes 2-Decalon zu entfernen. Die verbleibende rotbraune Wasserphase wird bei 50° Badtemperatur am Rotationsverdampfer fast vollständig eingeengt. Der Rückstand wird in 10 ml Fließmittel (Wasser/Methanol/Ammoniak 10% im Verhältnis 25/65/10) aufgenommen und über eine Lobar-Säule Größe B, gefüllt mit LiChroprep RP 8 40-63 µm, gegeben. Die gesammelten Fraktionen (Abb.48) zeigen eine zitronengelbe Farbe und grüne Fluoreszenz - grün aufgrund des ammoniakalischen Milieus; im sauren blau. Sie werden am Rotationsverdampfer eingeengt. Zurück bleibt ein gelbes Öl, aus dem beim Stehenlassen im Kühlschrank eine gelbe Substanz ausfällt.

Schmelzpunkt: 263°

Ausbeute: 0,28 g/12,3% d.Th.

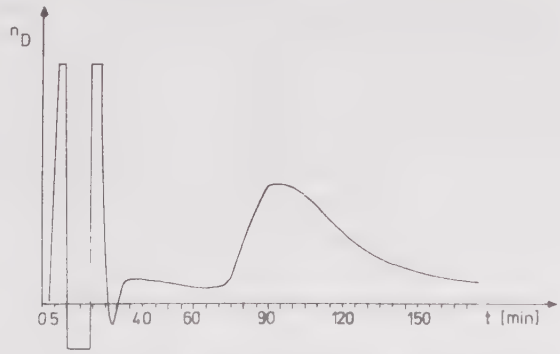


Abb.48: Chromatogramm der präparativen Säulenchromatographie von 98 über eine Lobar-Säule Größe B, gefüllt mit LiChroprep RP 8 40-63 µm; Elutionsmittel Wasser/Methanol/Ammoniak 10% im Verhältnis 25/65/10

Das IR-Spektrum (Abb.49) der Verbindung 98 entspricht weitgehend dem Cyclohexanon-NMN-Syntheseprodukt 97. Oberhalb 3000 cm^{-1} (3160 bis 3060 cm^{-1}) absorbieren die ungesättigten C-H-Valenzschwingungen. Zwischen 2940 und 2870 cm^{-1} liegen die symmetrischen und asymmetrischen CH_2/CH_3-Valenzschwingungen. Die $N-CH_3$-Resonanz ist nur schwach bei 2820 cm^{-1} zu erkennen. Bei 1690 cm^{-1}, etwas höher als im Cyclohexanon-NMN-Derivat, tritt die Carbonylgruppe auf. Die C=N-Bindung der Amidgruppe und die C=C-Bindung in Konjugation zur C=O-Gruppe erscheinen bei 1645 und 1615 cm^{-1} als zwei starke Banden. Die Absorptionen zwischen 1470 und 1420 cm^{-1} werden den CH_2/CH_3-Deformationsschwingungen zugeordnet.

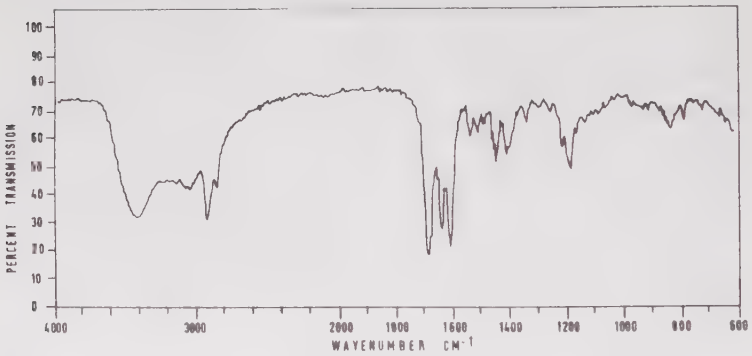


Abb.49: IR-Spektrum des Kondensationsproduktes aus 2-Decalon und N-1-Methylnicotinamidchlorid(98)

Das Elektronenspektrum des Hauptproduktes aus 2-Decalon und N-1-Methylnicotinamidchlorid in Wasser (Abb.50) ist fast identisch mit dem der Verbindung 97. Es besitzt zwei Maxima bei 364 und 257 nm. Die Schulter auf der abfallenden Seite bei 250 nm wird auch hier deutlich.

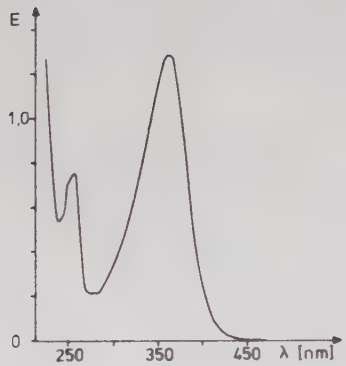


Abb.50: Elektronenspektrum von 98 in Wasser

Das Fluoreszenzspektrum in 0,01 N-HCl weist ein Anregungsmaximum bei 370 nm und ein Emissionsmaximum bei 468 nm auf (Abb.51).

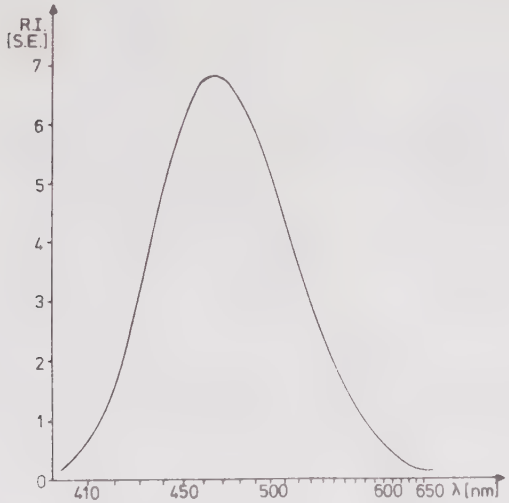
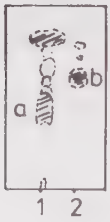


Abb.51: Emissionsspektrum von 98 in 0,01 N-HCl

Synthese von 4-[10,13,7'-trimethyl-7,12,1'-trioxo[2',7']-naphthyridino[4',3'-h]-tetra-decahydro-cyclopenta[a]-phenanthrenyl-(17)]-valeriansäure (99)

Die Darstellung erfolgt zunächst in Anlehung an die Synthese von HUFF[10]. Zu 1,25 g (7,5 mmol) NMN und 3,18 g (7,5 mmol) Dehydrocholsäure-Natrium, gelöst in etwa 50 ml Wasser, werden unter ständigem Rühren 4 ml 7 N-KOH zugetropft. Die Lösung färbt sich tiefgelb bis braun. Die Mischung bleibt 12 h bei Raumtemperatur stehen. Die Reaktionslösung wird dann mit etwa 7 ml konz. HCl versetzt und auf pH 1-2 gebracht. Es fällt ein weiß-gelbliches Produkt aus. Anschließend wird dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt, um den überwiegenden Teil nicht umgesetzter Dehydrocholsäure abzutrennen. Das Fluoreszenzprodukt ist in Chloroform unlöslich und verbleibt in der goldgelben wäßrigen Phase. Gleichzeitig sind weitere fluoreszierende Stoffe entstanden (Abb.52).



1 wäßrige Phase

2 Chloroform-Phase

a Hauptfluoreszenzprodukt Rf ~ 0,45
hellgrüne Fluoreszenz bei 366 nm
mit Iod anfärbbar ////

b Dehydrocholsäure Rf ~ 0,61
mit Iod anfärbbar ////

Abb.52: Schematisches DC des Reaktionsansatzes aus NMN und Dehydrocholsäure auf Antec-Dünnschichtchromatographie-Platten RP Opti C_{12} mit dem Fließmittel Methanol/Wasser/Ammoniak 10% = 10/6/4 entwickelt. Detektion: UV 366 nm, Iodkammer

Die Abtrennung gelingt nicht wie bei Verbindung 6 im Soxhlet-Extraktor. Da das Syntheseprodukt sowohl saure als auch basische Eigenschaften besitzt, läßt es sich nicht ausschütteln. Eine Isolierung erfolgt durch präparative Säulenchromatographie. Die wäßrige Lösung wird mit 10%igem Ammoniak auf pH 9 eingestellt und über eine Lobar-Säule Größe B, gefüllt mit LiChroprep RP 8 40-63 µm, gegeben. Als Elutionsmittel dient eine Mischung aus Wasser/Methanol/Ammoniak 10% im Verhältnis 70/25/5. Die entsprechenden Fraktionen (Abb.53) werden vereinigt und vorsichtig im Wasserstrahl-Vakuum auf dem Wasserbad zur Trockne eingeengt. Es entsteht ein dunkelbrauner Lack an der Gefäßwand.
Schmelzpunkt: 205° (beginnende Zersetzung)
Ausbeute: 0,69 g/16,6% d.Th.

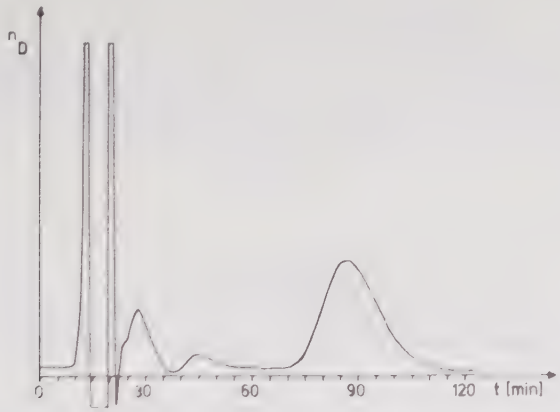


Abb.53: Chromatogramm der präparativen Säulentrennung von 99 über eine Lobar-Säule Größe B, gefüllt mit LiChroprep RP 8 40-63 µm; Elutionsmittel Wasser/Methanol/Ammoniak 10% im Verhältnis 70/25/5

Das IR-Spektrum (Abb.54) des Kondensationsproduktes aus Dehydrocholsäure und N-1-Methylnicotinamidchlorid zeigt um 3200 cm^{-1} die aromatische und zwischen 2960 und 2880 cm^{-1} die aliphatischen Valenzschwingungen. Die starke Resonanz bei 1695 cm^{-1} rührt von der C=O-Funktion des Naphthyridinteiles her. Bei 1650-1640 cm^{-1} und 1620 cm^{-1} absorbieren die C=N- und die C=C-Bindungen. Im Doppelbindungsbereich liegt die breite Absorptionsbande der Carboxylgruppe des Steroidgerüstes (1555 cm^{-1}). Die asymmetrischen Deformationsschwingungen der CH_2/CH_3-Gruppen treten zwischen 1460 und 1420 cm^{-1} und die symmetrischen zwischen 1395 und 1370 cm^{-1} auf.

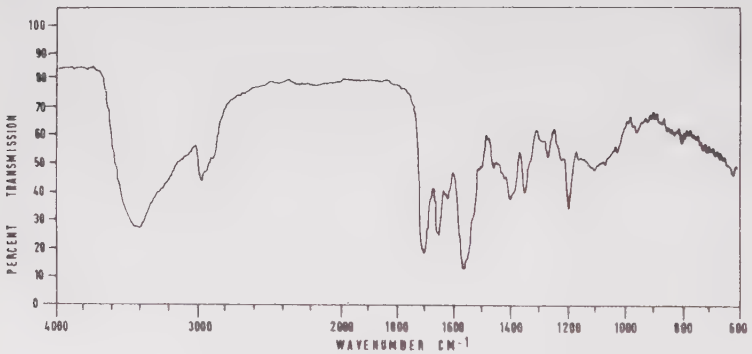


Abb.54: IR-Spektrum des Kondensationsproduktes aus Dehydrocholsäure und N-1-Methylnicotinamidchlorid(99)

Das Hauptprodukt der Synthese aus Dehydrocholsäure und N-1-Methylnicotinamidchlorid zeigt im Elektonenspektrum (gemessen in Wasser) die gleiche Kurvencharakteristik wie die Verbindungen 97 und 98 (Abb.55). Jedoch sind die Maxima zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben; 334 nm, 234 nm mit einer Schulter im Anstieg bei 250 nm und auf der abfallenden Seite bei 227 nm.

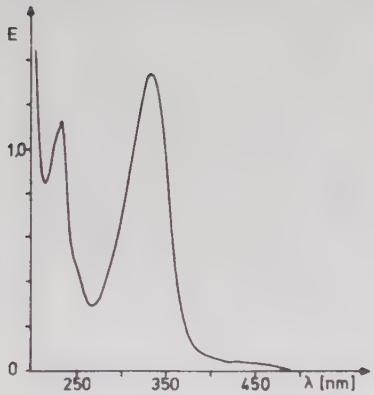


Abb.55: Elektronenspektrum von 99 in Wasser

Das Fluoreszenzspektrum des Syntheseproduktes in 0,01 N-HCl zeigt ein Anregungsmaximum bei 365 nm und ein Emissionsmaximum bei 450 nm (Abb.56). Für die Reaktionslösungen der Fluoreszenzmethode liegen die Werte um 360-365 nm und 445-450 nm.

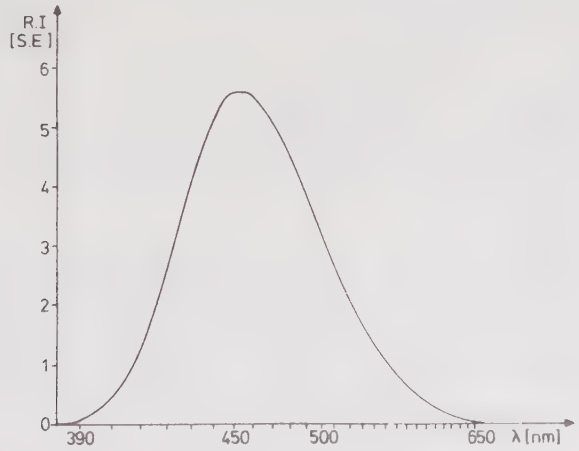


Abb.56: Emissionsspektrum von 99 in 0,01 N-HCl

Synthese von 2*H*,11*H*-2-Methyl-11-oxo-5,6-dihydro-naphtho-[1,2-c][2,7]-naphthyridin (100)

Zu 1,25 g (7,5 mmol) NMN, in etwa 5 ml Wasser gelöst, und 10,96 g (75 mmol) α-Tetralon werden 4 ml 7 N-KOH unter ständigem Rühren zugetropft. Dabei färbt sich die wäßrige Schicht hellbraun, die spezifisch schwerere α-Tetralon-Phase dunkelbraun. Die Mischung steht 12 h bei Raumtemperatur. Die Reaktion wird mit konz. HCl gestoppt. Beide Phasen werden in einen Scheidetrichter gegeben und dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die wäßrige Schicht wird am Rotationsverdampfer bei 50° Badtemperatur eingeengt. Der rotbraune Rückstand wird in 10 ml Fließmittel (Wasser/Methanol/Ammoniak 25% im Verhältnis 41/45/4) aufgenommen und über eine Lobar-Säule Größe B, gefüllt mit LiChroprep RP 8 40-63 µm, getrennt. Die gesammelten Fraktionen (Abb.57) weisen eine gelbe Farbe und grüne Fluoreszenz auf. Sie werden sofort am Rotationsverdampfer bei 50° Badtemperatur eingeengt. An der Gefäßwand haftet ein hellgelber, kristalliner Rückstand.

Schmelzpunkt: 210° (beginnende Zersetzung)

Ausbeute: 0,23 g/10,2% d.Th.

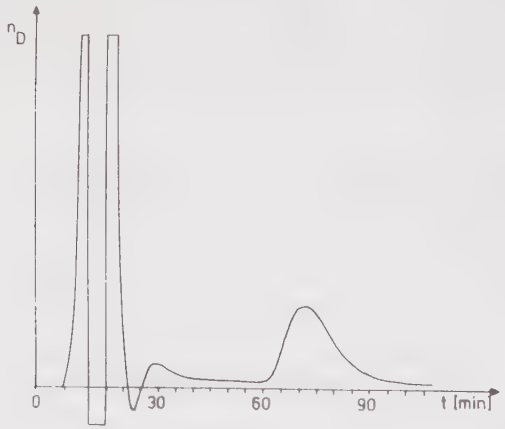


Abb.57: Chromatogramm der präparativen Säulentrennung von 100 über eine Lobar-Säule Größe B, gefüllt mit LiChroprep RP 8 40-63 µm; Elutionsmittel Wasser/Methanol/Ammoniak 25% im Verhältnis 41/45/4

Das isolierte Syntheseprodukt aus α-Tetralon und N-1-Methylnicotinamidchlorid weist im IR-Spektrum (Abb.58) die charakteristischen Banden des 2,7-Naphthyridingerüstes auf. Zwischen 3200 bis 3150 und 3070 bis 3050 cm^{-1} liegen die ungesättigten C-H-Absorptionsfrequenzen bzw. die schwachen Valenzschwingungsbanden des Aromaten. Bei 3000 bis 2920 cm^{-1} treten die CH_2/CH_3-Valenzschwingungen auf. Die höchste und zugleich intensivste Bande im Doppelbindungsbereich (1680 cm^{-1}) wird der Carbonylfunktion der Amidstruktur zugeordnet. Die benachbarten, schwächeren Resonanzen bei 1640 und 1610 cm^{-1} dürften von den Valenzschwingungen der α,β-ungesättigten C=N-Bindung und der C=C-Doppelbindung in Konjugation mit dem aromatischen Ring herrühren. Diese Banden werden überlagert von den Absorptionen der C=C-Valenzen des Aromaten.

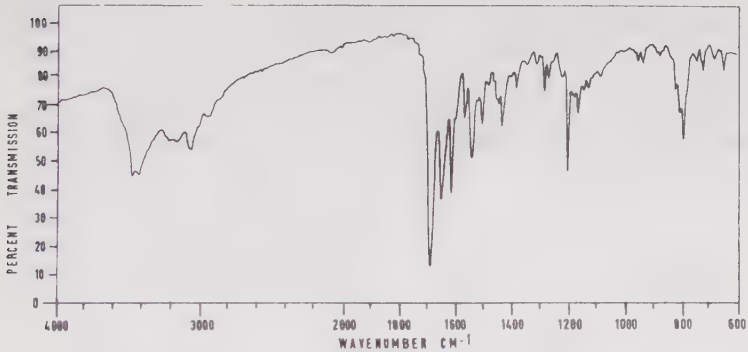


Abb.58: IR-Spektrum des Kondensationsproduktes aus α-Tetralon und N-1-Methylnicotinamidchlorid(100)

Das Elektronenspektrum des α-Tetralon-N-1-Methylnicotinamidchlorid-Hauptproduktes 100 in Wasser (Abb.59) besitzt bei 408 nm ein intensives Maximum mit einer Schulter um 330 nm. Zwei direkt benachbarte, schwächere Maxima liegen bei 268 (Schulter um 280 nm) und 250 nm.

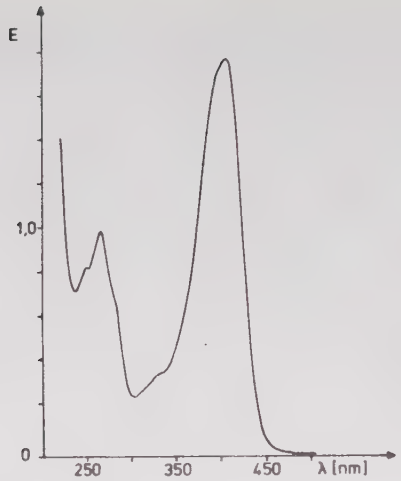


Abb.59: Elektronenspektrum von 100 in Wasser

Im Fluoreszenzspektrum findet man bei 412 nm ein Anregungs- und bei 464 nm ein Emissionsmaximum (Abb.60, gemessen in 0,01 N-HCl).

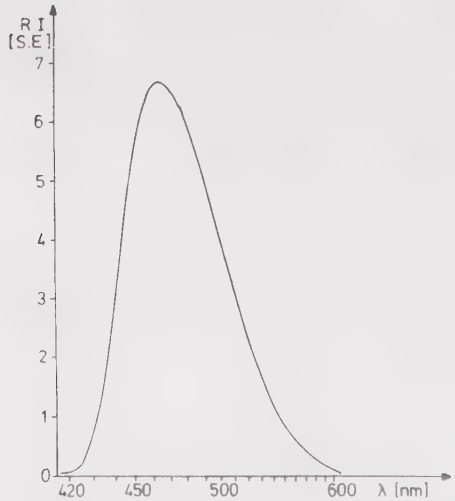


Abb.60: Emissionsspektrum von 100 in 0,01 N-HCl

Synthese von 2*H*,12*H*-2-Methyl-12-oxo-5,6-dihydro-naphtho-[1,2-c] [2,7]-naphthyridin-6-spiro-3'-piperidin-2',6'-dion (101)

1,8 g (7,5 mmol) Alonimid werden in 50 ml 99%igem Ethanol in der Wärme gelöst und mit einer wäßrigen Lösung aus 1,25 g (7,5 mmol) NMN versetzt. Unter ständigem Rühren läßt man 4 ml 7 N-KOH zutropfen. Die Lösung färbt sich tief orangerot. Nach 12 h Stehen bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung mit 50%iger Ameisensäure auf pH 4 angesäuert und zweimal mit Chloroform und einmal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die danach auf ammoniakalischen pH eingestellte braune Lösung wird über eine Lobar-Säule Größe B, gefüllt mit LiChroprep RP 8 40-63 µm, gegeben. Als Fließmittel dient eine Mischung aus Wasser/Methanol/Ammoniak 25% im Verhältnis 97/5/2. Infolge der geringen Fließmittelstärke und großen Zahl an Stoffen ähnlicher Polarität in der Probenlösung wird auf eine Optimierung der Trennung verzichtet und stattdessen die Lösung mehrmals über die Säule gegeben. Die das Fluoreszenzprodukt enthaltenden Fraktionen (Abb.61) sind gelb und zeigen eine grüne Fluoreszenz. Sie werden am Rotationsverdampfer bei 50° Badtemperatur zur Trockne eingeengt. Es bleibt ein hell gelbgrüner Lack zurück.
Schmelzpunkt: 195° (beginnende Zersetzung)
Ausbeute: 0,28 g/9,4% d.Th.

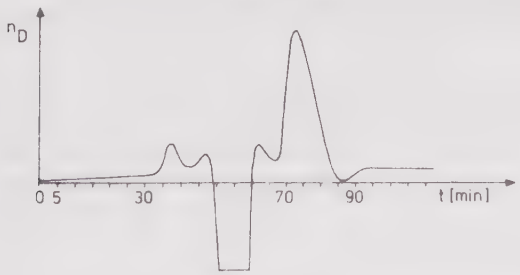


Abb.61: Chromatogramm der präparativen Säulentrennung für eine bereits einmal über Säule vorgereinigte Substanz von 101 über eine Lobar-Säule Größe B, gefüllt mit LiChroprep RP 8 40-63 µm; Elutionsmittel Wasser/Methanol/Ammoniak 25% im Verhältnis 97/5/2

Im IR-Spektrum des isolierten Syntheseproduktes aus Alonimid und N-1-Methylnicotinamidchlorid (Abb.62) findet man zwischen 3200 und 3000 cm^{-1} die ungesättigten C-H-Valenzschwingungen. Die starke Bande bei 1670 cm^{-1} rührt von der C=O-Funktion her. Die schwächeren Absorptionen bei 1630 und 1600 cm^{-1} könnten durch die Valenzschwingungen der α,β-ungesättigten C=N-Gruppierung und der mit dem Aromaten konjugierten C=C-Bindung hervorgerufen werden. In diesem Bereich treten ebenfalls die Absorptionen der C=C-Valenzen des Aromaten auf.

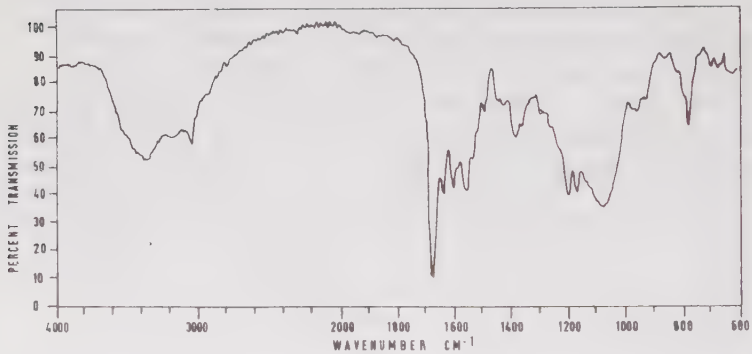


Abb.62: IR-Spektrum des Kondensationsproduktes aus Alonimid und N-1-Methylnicotinamidchlorid (101)

Das Elektronenspektrum des isolierten Produktes aus Alonimid und N-1-Methylnicotinamidchlorid in Wasser (Abb.63) zeigt gleichen Kurvenverlauf wie die Modellverbindung 100. Das Hauptmaximum liegt bei 400 nm. Die zwei schwächeren Banden sind geringfügig auseinander gezogen; 264 nm mit Schulter bei etwa 280 nm und 247 nm.

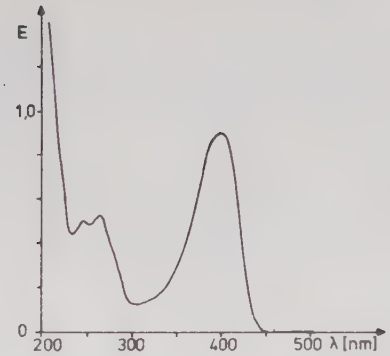


Abb.63: Elektronenspektrum von 101 in Wasser

Das Fluoreszenzspektrum dieser Verbindung in 0,01 N-HCl besitzt bei 408 nm ein Anregungs- und bei 470 nm ein Emissionsmaximum (Abb.64). Die Reaktionslösung der Fluoreszenzmethode zeigt Maxima bei 408-410 nm und 460 nm.

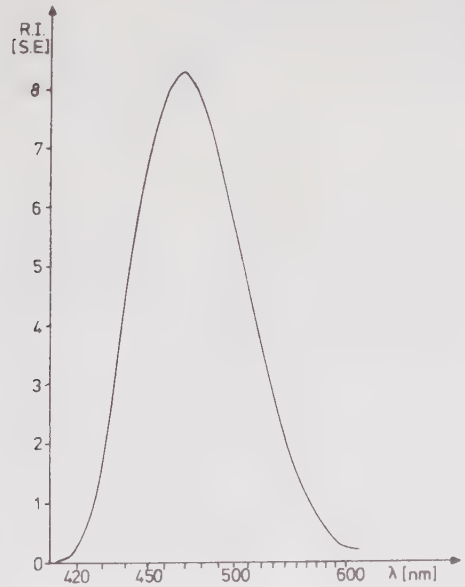


Abb.64: Emissionsspektrum von 101 in 0,01 N-HCl

Tab.28: Tabellarische Zusammenfassung der Rf-Werte von den Verbindungen 97, 98, 99, 100, 101

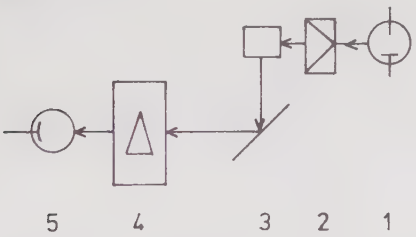
HPTLC-Platten Merck RP 8		
Elutionsmittel: Wasser/Methanol/Ammoniak 10%		
	2 14 4	
Cyclohexanon-NMN-Derivat	97	Rf ~ 0,49
α-Tetralon-NMN-Derivat	100	Rf ~ 0,51
2-Decalon-NMN-Derivat	98	Rf ~ 0,32
ANTEC-Fertigplatten RP Opti C_{12}		
Elutionsmittel: Wasser/Methanol/Ammoniak 10%		
	6 10 4	
Alonimid-NMN-Derivat	101	Rf ~ 0,64
DHS-NMN-Derivat	99	Rf ~ 0,45

9. Anhang

Ergänzende Untersuchungen zur fluorimetrischen Bestimmung von Digitoxin

Die Probenlösung wird nach der Vorschrift von NAKAMURA und TAMURA[9] vorbereitet. Es werden 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} und 10^{-2} molare Lösungen der Carbonylkomponente (Digitoxin) eingesetzt. Die Reaktionslösung ist dementsprechend $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ bis $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ molar (100 µl der Carbonyllösung in 1800 µl Gesamtvolumen). Als Lösungsmittel dienen destilliertes Wasser, Ethanol-Uvasol^R und Methanol-Uvasol^R für die Fluoreszenzsprektroskopie.
Zur Messung wird das Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss zunächst mit folgender Meßanordnung benutzt:

Meßanordnung A



1 Strahlungsquelle Hg-Lampe ST 41
2 Anregungsfilter 365 nm
3 Probenwechsler
4 Monochromator
5 Empfänger

Wasser erweist sich als das günstigste Lösungsmittel, da eine Referenzlösung bestehend aus Wasser, NMN, Natronlauge und Ameisensäure die niedrigste Fluoreszenzintensität zeigt im Vergleich zu ethanolischer bzw. methanolischer Referenzlösung bei gleicher Geräteeinstellung. Dennoch muß eine relativ hohe Grundfluoreszenz in Kauf genommen werden, da sich die meisten Verbindungen nicht in Wasser lösen; so Digitoxin. Selbst einstündige Behandlung mit Ultraschall ergibt keine klare 10^{-5} molare Lösung. Da jedoch quantitative Auswertungen eine genau definierte Lösung erforderlich machen, ist Ethanol das Lösungsmittel der Wahl.

Erste Messungen mit Digitoxin (Abb.65) ergeben sehr schwache Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu Acetophenonreaktionslösungen gleicher Konzentration. Dies bedingt maximale Verstärkung am Gerät und automatisch eine relative Erhöhung des Referenzwertes. Eine Mindestkonzentration von 10^{-5} molar ist erforderlich. Dennoch treten bei Subtraktion der Referenz- von den Probenwerten teilweise negative Ergebnisse auf.

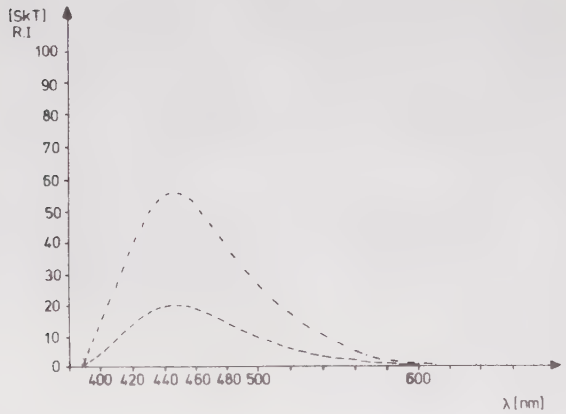


Abb.65: Emissionsspektren aus Meßanordnung A, $\lambda_{Fc.}$ = 365 nm Verst. 10/10/II, Spalt 0,04 mm, F_{53} bei 600 nm auf 100 SkT eingestellt

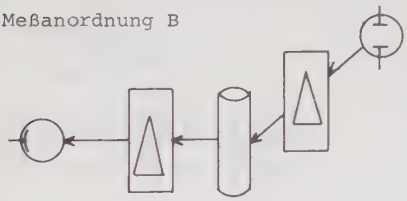
····· $5,6 \cdot 10^{-5}$ molare Digitoxinreaktionslösung minus Ethanol-Referenzwert

·-·-· $5,6 \cdot 10^{-6}$ " "

----- $5,6 \cdot 10^{-7}$ " "

Da dieser Geräteaufbau keinen automatischen Wellenlängenantrieb und keinen Schreiber besitzt, muß die Kurve Punkt für Punkt aufgenommen und dann gezeichnet werden. Dadurch bleibt die Probe unnötig lange im Strahlengang. Das Driften des Gerätes während der Messung höherer Werte wirkt sich stark auf das Ergebnis aus.
Da die Quecksilberlampe nur ein Linienstrahler ist, und der Filter die stärkste Bande bei 365 nm ausfiltert, kann mit der Meßanordnung A kein Anregungsspektrum aufgenommen werden. Dieses aber kann Auskunft geben, ob 365 nm zur Anregung des Digitoxinfluoreszenzproduktes überhaupt geeignet ist.
Die Messungen werden deshalb in einer anderen Anordnung wiederholt, die allerdings ursprünglich für Festkörperfluoreszenzmessungen aufgebaut war (Zeiss-Geräte):

Meßanordnung B



1 Xenonhochdrucklampe
2 Monochromator
3 runde Quarzgläser
4 Monochromator
5 Empfänger

Zur Meßanordnung A bestehen folgende Unterschiede:

- Xenonhochdrucklampe XBO 450 W mit 10 facher Strahlungsintensität der Quecksilberlampe
- offener Probenraum
- keine fixe Meßgeometrie
- runde Quarzgläser
- zwei Monochromatoren
- Wellenlängenantrieb
- Schreiber
- Strahlenverlauf in derselben Ebene, Fluoreszenzstrahlung im Winkel von 90° gemessen.

Aus den ersten Meßkurven am PMQ II System geht ein Emissionsmaximum für die Digitoxinreaktionslösung um 440-450 nm hervor. Deshalb wird bei 450 nm Emission ein Anregungsspektrum gemessen. Eine $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molare Digitoxinreaktionslösung ergibt ein Anregungsspektrum mit Maximum bei etwa 354 nm (Abb.66).

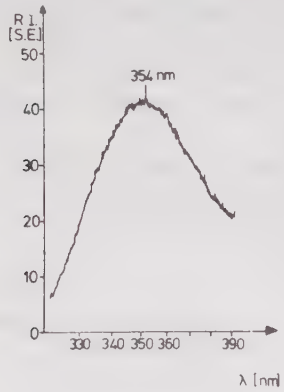


Abb.66: Anregungsspektrum einer $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molaren Digitoxinreaktionslösung
1) var. /0,2 mm
2) 450 nm /0,09 mm

Ein Anregungsmaximum konnte bei einer $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ und $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ molaren Probenlösung trotz verschiedener Meßbedingungen nicht gefunden werden (Abb.67a-c).

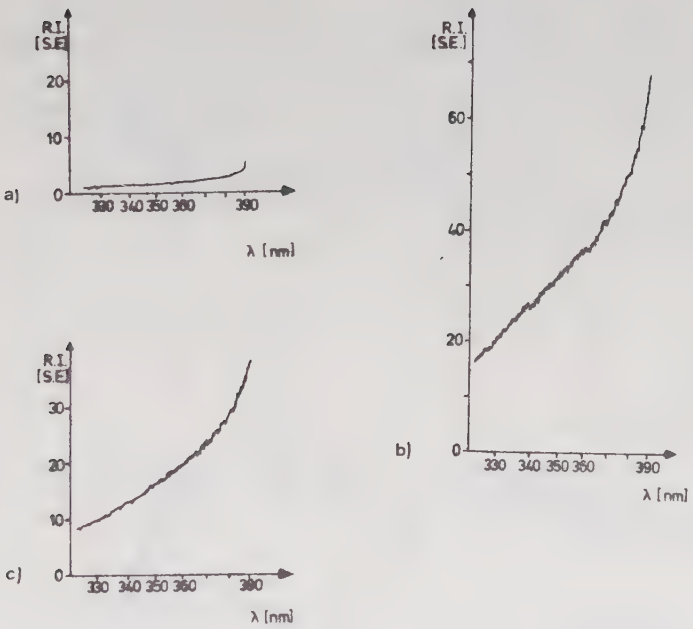


Abb.67: Anregungsspektren

a) 5,6 · 10^{-6} molare Digitoxinreaktionslösung

1) var. /2 mm
2) 450 nm/0,026 mm

b) 5,6 · 10^{-6} molare Digitoxinreaktionslösung

1) var. /0,2 mm
2) 450 nm/0,2 mm

c) 5,6 · 10^{-4} molare Digitoxinreaktionslösung

1) var. /0,2 mm
2) 450 nm/0,09 mm

Es werden dann die Emissionsspektren der Referenz- und verschiedenen Probenlösungen gemessen. Um die Kurven mit den bereits vorhandenen der Meßanordnung A vergleichen zu können,

muß die Anregungswellenlänge von 365 nm vorläufig beibehalten werden. Die Einstellungen am Gerät sind über alle Messungen konstant (Spalt, Verstärkung, Wellenlängenantriebsgeschwindigkeit, Schreibergeschwindigkeit). Die Spektren des reinen Lösungsmittels (Ethanol-Uvasol^{R}, siehe Abb.71), der Referenzlösung, der $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ und der $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ molaren Digitoxinreaktionslösung zeigen einen zunehmend steileren Anstieg zum Primärlicht (Anregungswellenlänge)(Abb.68a-e).

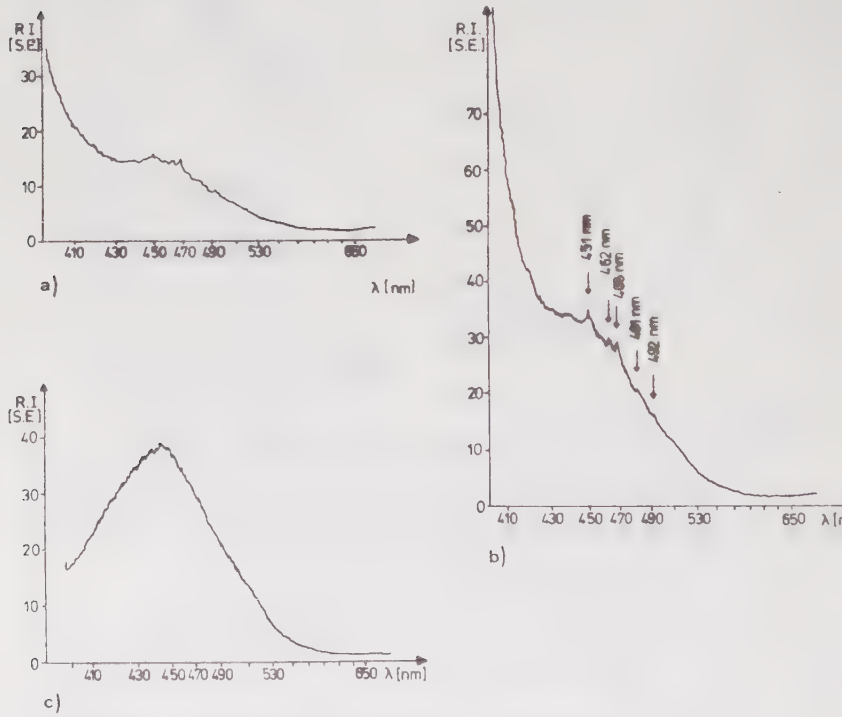


Abb.68a-c: Emissionsspektren
1) 365 nm/2,0 mm
2) var. /0,06 mm
a) Ethanol-Referenzlösung
b) $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ molare Digitoxinreaktionslösung
c) $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ molare Digitoxinreaktionslösung

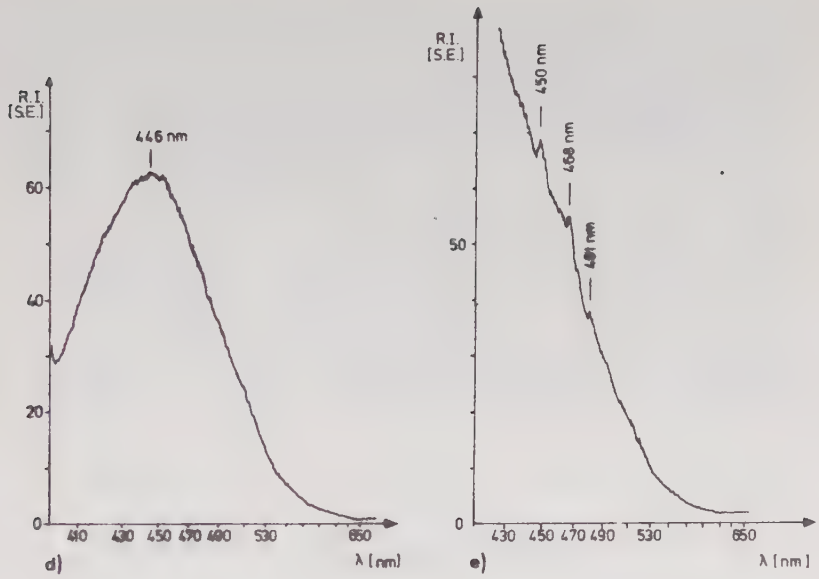


Abb.68d,e: Emissionsspektren
d) $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molare Digitoxinreaktionslösung
e) $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ molare Digitoxinreaktionslösung

Zwischen 450 und 490 nm tritt bei reinem Lösungsmittel, bei der Referenzlösung und bei der $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ molaren Digitoxinreaktionslösung eine Schulter mit Feinstruktur auf. Bei der $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ molaren Lösung ist der Anstieg zum Primärlicht so steil, daß die schwache Schulter fast verschwindet und nur die Feinstruktur zurückbleibt. Zeichnet man den Anstieg des Primärlichtes unter die jeweilige Kurve und betrachtet nur die aufgelagerte Feinstruktur, so ergeben sich bei gleichen Meßbedingungen etwa gleiche Intensitäten eben dieser Feinstruktur. Man kann also die Spektren

zunächst einmal miteinander vergleichen, ohne die Feinstruktur zu berücksichtigen. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich dabei um die Linien aus dem Lampenspektrum handeln könnte, muß aber noch bewiesen werden.
Die Spektren der 5,6 · 10^{-6} und 10^{-5} molaren Probenlösung zeigen ein ausgeprägtes Maximum um 450 nm. Die Feinstruktur ist aufgrund des sehr viel höheren Signals des Fluoreszenzproduktes überlagert und geht im Rauschen des Schreibers unter. Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung der 5,6 · 10^{-5} molaren Digitoxinreaktionslösung ist größer als die der 5,6 · 10^{-6} molaren. Genauere quantitative Aussagen sind an dieser Stelle nicht möglich (Abb.69).

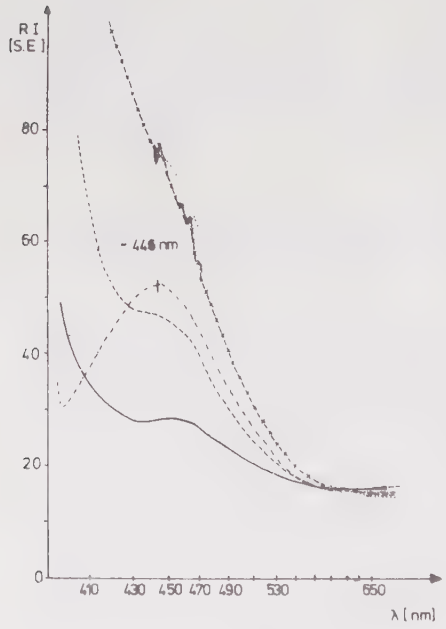


Abb.69: Emissionsspektren der Digitoxinreaktionslösungen aus Abb.68a-e

——— Ethanol-Referenzlsg.
------ 5,6 · 10^{-7} molar
-·-·-· 5,6 · 10^{-6} molar
····· 5,6 · 10^{-5} molar
-x-x-x 5,6 · 10^{-4} molar

Vergleicht man das Anregungs- und das Emissionsspektrum der 5,6 · 10^{-5} molaren Digitoxinreaktionslösung mit einander (Abb.70), so läßt sich feststellen, daß keine große Verschiebung zwischen Grund- und Anregungszustand vorliegt - 20 nm - und keine Fluoreszenzlöschung durch Reabsorption in der Lösung auftritt.

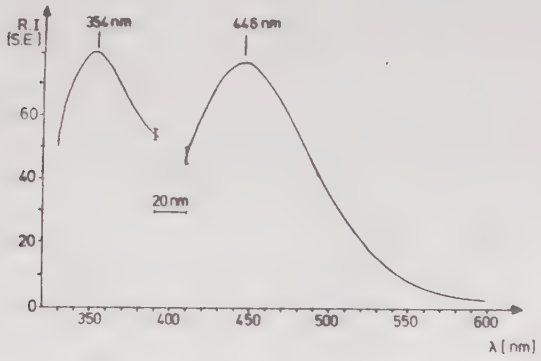


Abb.70: Anregungs- und Emissionsspektrum einer 5,6 · 10^{-5} molaren Digitoxinreaktionslösung

Man ist bestrebt, so weit wie möglich vom Emissionsmaximum entfernt anzuregen, um den absteigenden Teil der Kurve voll zu erfassen. Es wird deshalb willkürlich 330 nm als Anregungswellenlänge auf der kürzerwelligen Seite des Anregungsmaximums gewählt. Da diese Strahlung sehr viel energiereicher ist (als 365 nm), werden höhere Anregungszustände erreicht. Die Elektronenübergänge treten verstärkt auf.

Das Spektrum des reinen Ethanol-Uvasol^{R} zeigt nur einen Anstieg zum Primärlicht (Abb.71).

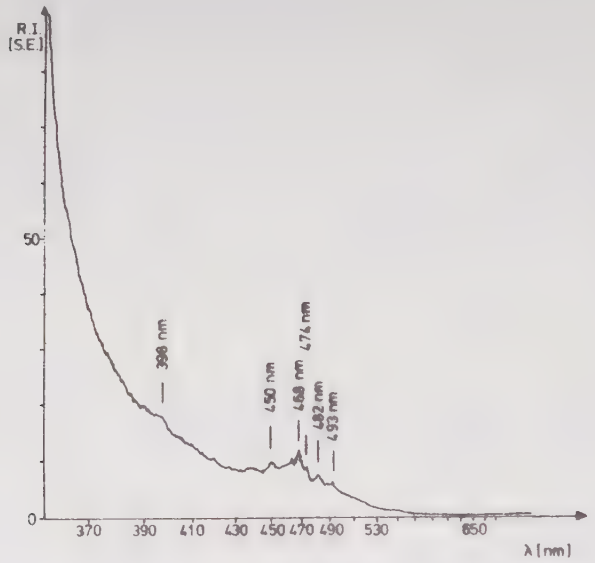


Abb.71: Emissionsspektrum für reines Ethanol-Uvasol^{R}
1) 330 nm/2,0 mm
2) var. /0,06 mm

Bei der Ethanol-Referenzlösung (Abb.72a) bildet sich ein Maximum bei etwa 390 nm aus. Dieses Maximum ist bei der $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ molaren Digitoxinreaktionslösung (Abb.72b) deutlich verbreitert durch Überlagerung eines zweiten Maximums ungefähr bei 450 nm (Schulter im Ansteig zum Maximum). Bei der $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molaren Lösung (Abb.72c) gehen beide Maxima in ein daraus resultierendes breites Maximum über (Abb.73).

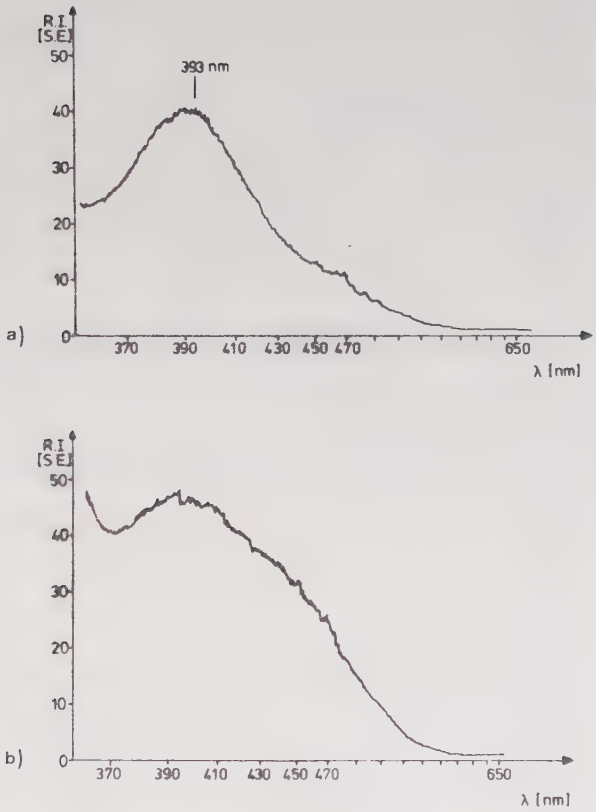


Abb.72a,b: Emissionsspektren

1) 330 nm/2,0 mm
2) var. /0,06 mm

a) Ethanol-Referenzlösung
b) $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ molare Digitoxinreaktionslösung

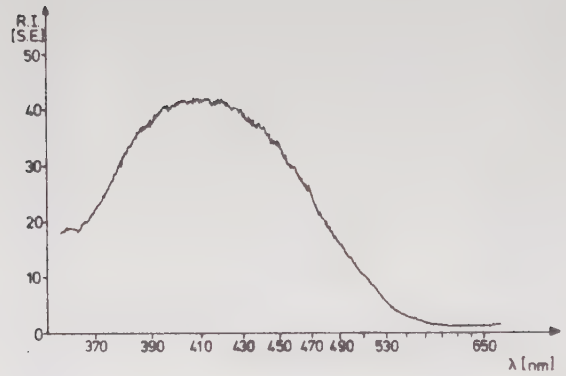


Abb.72c: Emissionsspektrum
$5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molare Digitoxinreaktionslösung

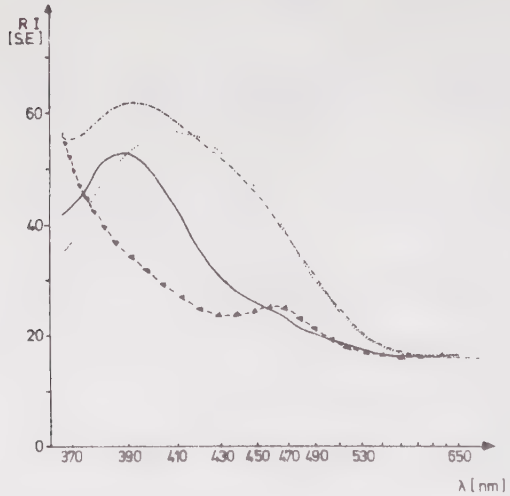


Abb.73: Emissionsspektren der Reaktionslösungen aus Abb.71 und 72a-

-▲-▲- Ethanol-Uvasol^{R}
——— Ethanol-Referenzlösung
····· $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molare Digitoxinreaktionslösung
·-·-· $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ molare Digitoxinreaktionslösung

Die letzte Meßreihe ergibt, daß 330 nm als Anregungswellenlänge nicht geeignet ist, da anscheinend noch andere durch die Reaktionskomponenten entstandene Fluoreszenzen bei etwa 390 nm auftreten.
Auf der Suche nach weiterer Verbesserung der Meßbedingungen wird ein anderer Multiplier ins Empfängergehäuse eingebaut. Durch Austausch des zuvor mehr rotempfindlichen gegen einen grünempfindlichen Multiplier können die Meßwerte infolge der höheren Quantenausbeute etwas erhöht werden. Die maximale Verstärkung des Schreibers wird teilweise heruntergesetzt. Allerdings muß ein stärkeres Grundrauschen inkauf genommen werden.
Am Charakter der Spektren ändert sich nichts. Bei einer Anregung von 365 nm zeigen wiederum die $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ und 10^{-5} molare Digitoxinreaktionslösung ein ausgeprägtes Maximum um 450 nm. Die $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ und 10^{-4} molare Lösung enthalten die Schulter im Anstieg zum Primärlicht, die nicht mehr aufzulösen ist (Abb.74).

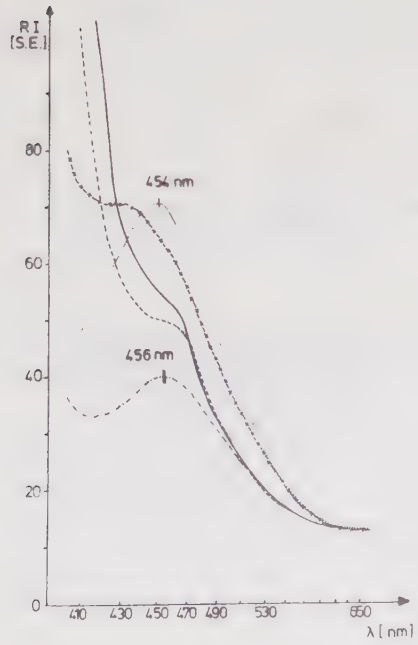


Abb.74: Emissionsspektren mit grünempfindlichem Multiplier
1) 365 nm/2,0 mm
2) var. /0,06 mm

——— Ethanol-Referenzlösung
------ $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ molare Digitoxinreaktionslsg.
·-·-·- $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ "
····· $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ "
-x-x-x $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ "

Unter diesen Bedingungen wird erneut versucht, den absteigenden Teil der Bande weiter in den kurzwelligen Bereich zu verfolgen und jetzt im Anregungsmaximum bei 354 nm zu messen. Bereits hier ist das Emissionsmaximum verbreitert und nur bei der $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molaren Lösung gut aufgelöst. Außerdem ist eine leichte hypsochrome Verschiebung des Maximums zu beobachten (Abb.75).

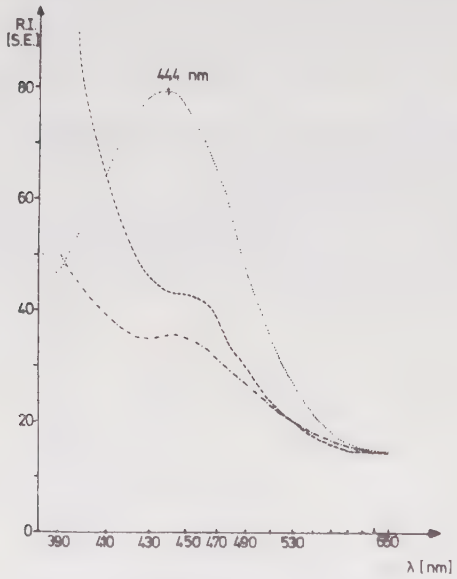
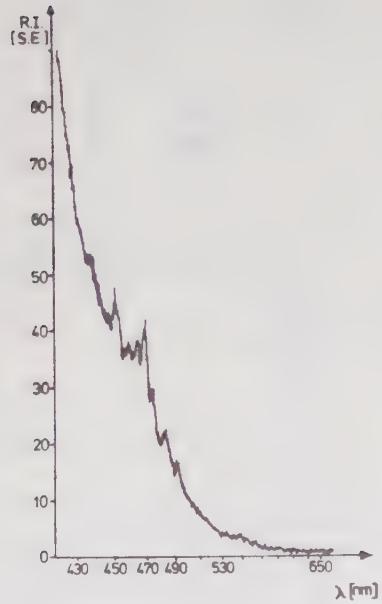


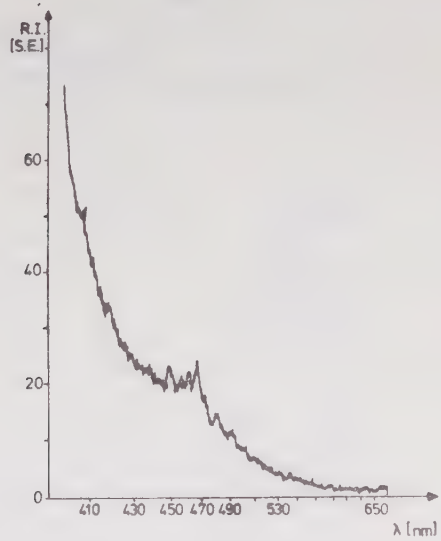
Abb.75: Emissionsspektren
1) 354 nm/2,0 mm
2) var. /0,06 mm
------ $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ molare Digitoxinreaktionslösung
·-·-·- $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ molare Digitoxinreaktionslösung
····· $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molare Digitoxinreaktionslösung

Für weitere Messungen scheint deshalb 365 nm die geeignetere Anregungswellenlänge zu sein.

Bei weiteren Messungen tritt ein neues Problem auf. Eine Meßreihe verschiedener Ethanol-Uvasol^{R}-Reaktionslösungen ergibt scheinbar unterschiedliche Spektren (Abb.75a-g), die von gleichen Lösungen nicht erwartet werden dürfen.



a)

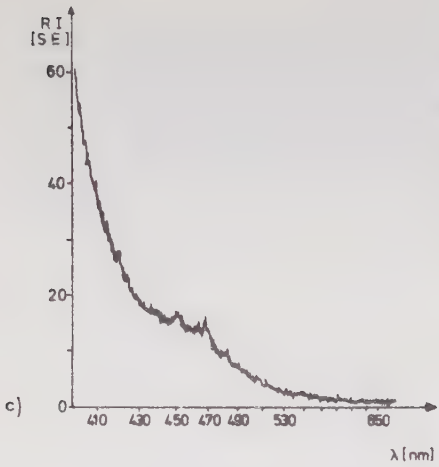


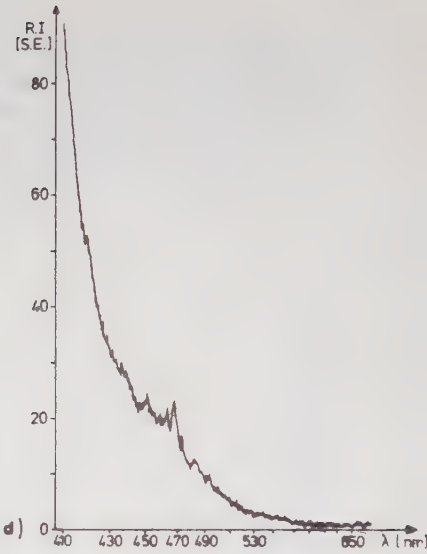
b)

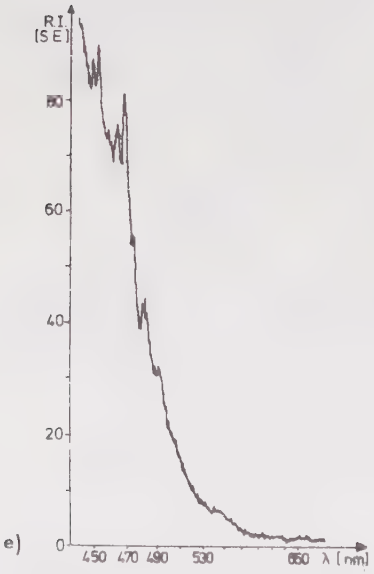
Abb.75a,b: Emissionsspektren von Ethanol-Referenzlösungen

1) 365 nm/2,0 mm
2) var. /0,06 mm

a) und b) dieselbe Referenzlösung







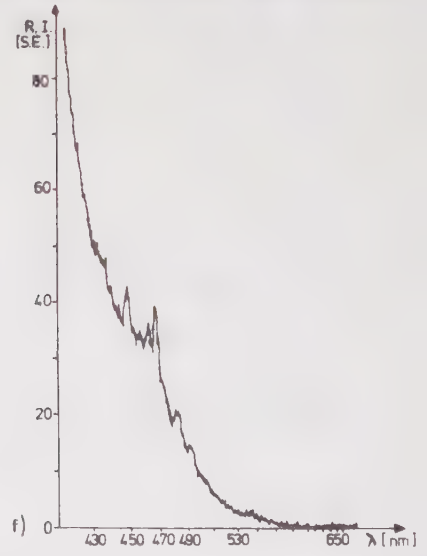


Abb.75c-f: Emissionsspektren
c) Referenzlösung aus Ethanol-Uvasol$^{R}_{1}$
d) Referenzlösung aus Ethanol-Uvasol$^{R}_{2}$
e) und f) Wiederholung der Messungen der Lösungen a), c)

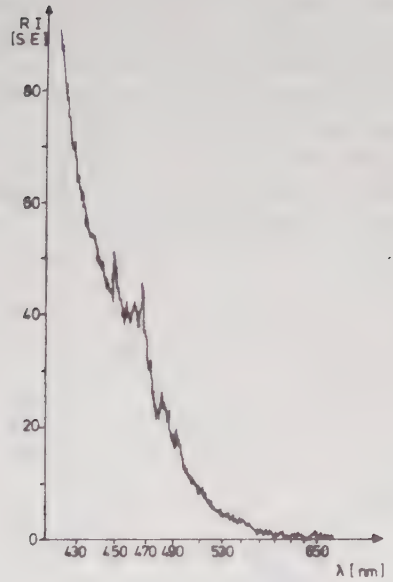
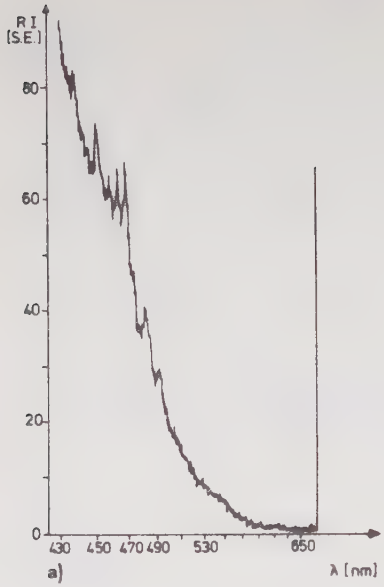
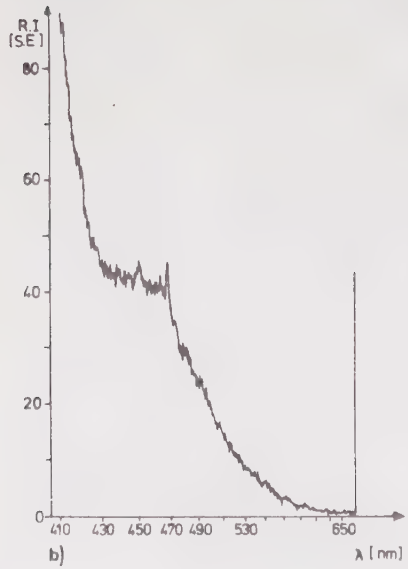


Abb.75g: Emissionsspektrum
Wiederholung der Messung der Lösung d)

Da der apparative Aufbau keine fixe Meßgeometrie darstellt und runde Quarzfilter eingesetzt werden, führt dies je nach Justierung der Küvetten zu unterschiedlichem Erfassen an meßbarem Primärlicht. Vorbedingung ist eine konstante Bandbreite und Messung vom langwelligen Bereich ausgehend zum kürzeren. Wenn vergleichsweise längerwellig (im Vergleich zu einem anderen Experiment) ein Schreibervollausschlag auftritt, um so mehr Primärlicht kommt am Empfänger an. Der Anstieg zum Primärlicht ist steiler (Abb.76a: Schreibervollausschlag bei 430 nm; Abb.76b,c: Schreibervollausschlag bei 410 nm). Die aufgelagerte Feinstruktur hat immer die gleiche Intensität bei derselben Menge Primärlicht. Die auf den ersten Blick unterschiedlich erscheinenden Spektren sind somit identisch.





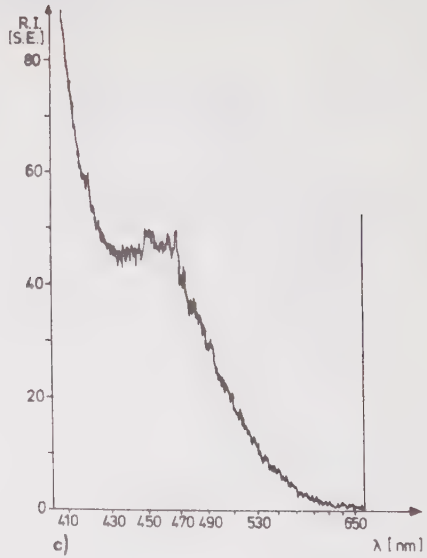


Abb.76a-c: Emissionsspektren derselben Ethanol-Referenzlösung für unterschiedliches Einjustierungssignal in $\lambda_{Em.max.}$ 450 nm. 1) 365 nm/2,0 mm 2) var. /0,06 mm

Um den Verdacht auf Einflüsse der Xenonlampe auf das Fluoreszenzspektrum zu prüfen - die möglicherweise die häufig auftretende Feinstruktur bedingt -, wird anstelle der Quarzgläser ein Spiegel in den Strahlengang gesetzt. Dieser reflektiert einen Teil des Primärlichtes. Das so erhaltene Spektrum ergibt eindeutig dieselbe Feinstruktur (Abb.77). Das Lampensignal ist also immer in derselben Intensität dort aufgelagert, wo kein oder nur sehr wenig Fluoreszenzprodukt gebildet wird. Ansonsten gehen diese verhältnismäßig schwachen Peaks unter dem Anstieg zum Maximum verloren.

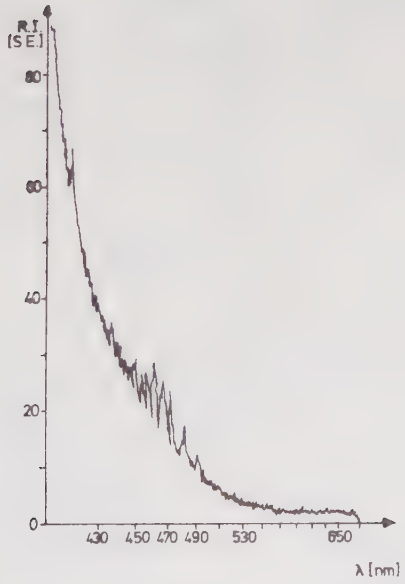


Abb.77: Emissionspektrum

Messung des Primärstrahles der Xenon-Hochdrucklampe mittels Spiegel

1) 365 nm/0,2 mm
2) var. /0,005 mm

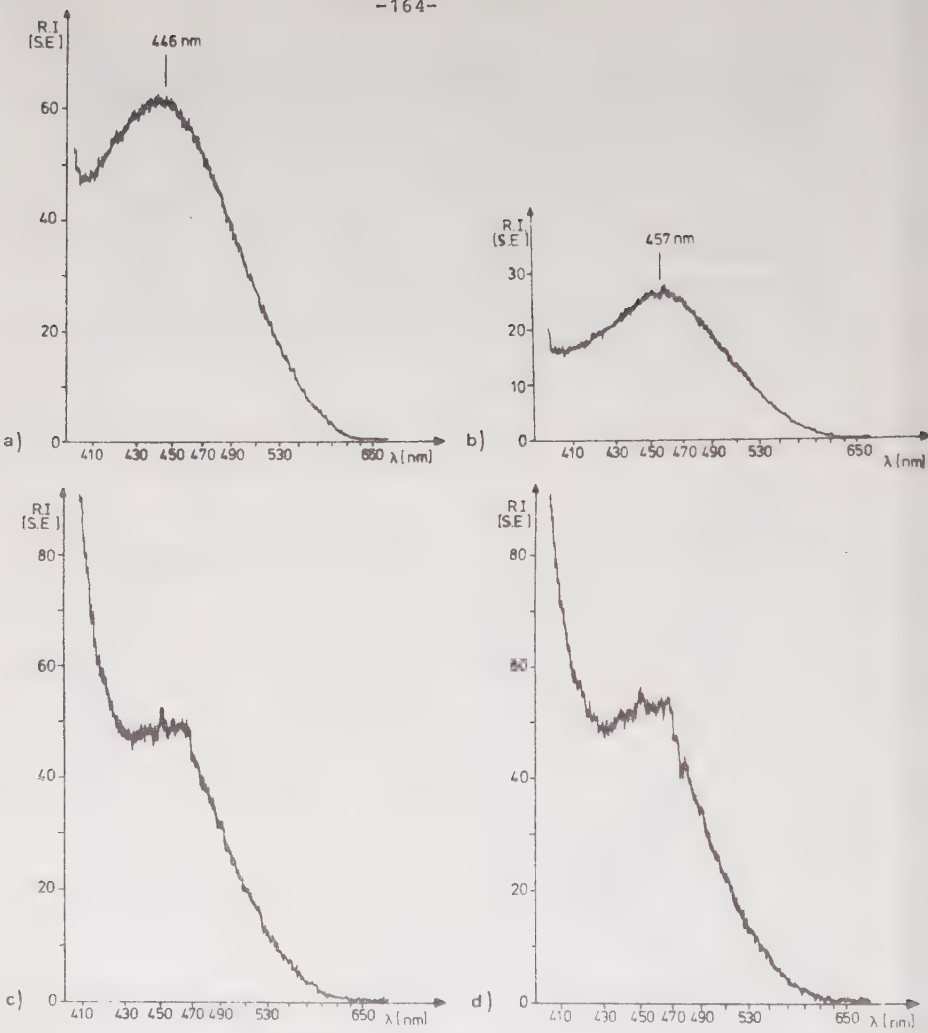
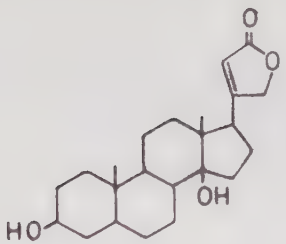


Abb.78a-d: Emissionsspektren einer Digitoxigeninreaktionslösung

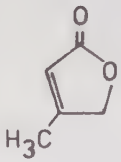
1) 365 nm/2,0 mm
2) var. /0,06 mm

a) $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ molar
b) $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molar
c) $5{,}6 \cdot 10^{-6}$ molar
d) $5{,}6 \cdot 10^{-7}$ molar

Sollte die anfangs aufgestellte Überlegung stimmen, daß sich auch die Gruppierung $-CO-O-CH_2-$ im Lactonring mit N-1-Methylnicotinamidchlorid zu einem fluoreszierenden Produkt umsetzt, müßten ebenfalls Digitoxigenin (u.a.) oder eine Modellsubstanz wie ß-Methyl- $\Delta^{\alpha,\beta}$ -butenolid dasselbe Fluoreszenzprodukt bilden.



37



35

Es werden die einzelnen Messungen für Digitoxigenin wiederholt. In der Meßanordnung B kann unter gleichen Bedingungen wie bei Digitoxin kein Anregungsspektrum aufgenommen werden.
Die Emissionsspektren werden ebenso bei 365 nm gemessen (Abb.78a-d).

Sie ergeben ein sehr ähnliches Aussehen, aber erst in 1o fach konzentrierterer Lösung: bei einer 10^{-3} und 10^{-2} molaren Digitoxigeninlösung. Das Maximum liegt im Bereich von 450 nm. Alle weiteren gemachten Beobachtungen treten auch hier auf (Abb.79,80).

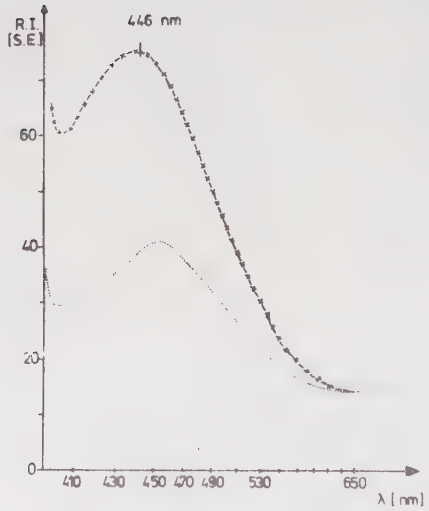


Abb.79: Emissionsspektren der Digitoxigeninreaktionslösungen aus Abb.50a,b

····· $5,6 \cdot 10^{-5}$ molar

-x-x-x- $5,6 \cdot 10^{-4}$ molar

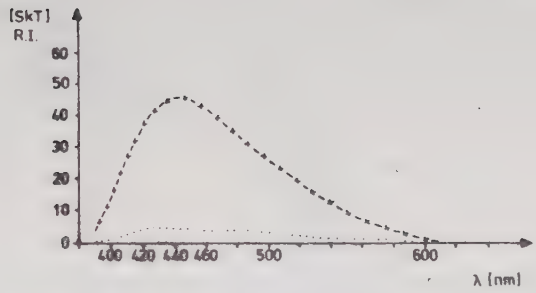


Abb.80: Emissionsspektren einer Digitoxigeninreaktionslösung minus Ethanol-Referenzwert, Meßanordnung A, maximale Verstärkung, Spalt 0,04 mm

-x-x-x- $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ molar

····· $5{,}6 \cdot 10^{-5}$ molar

Eine geringe Menge an Modellsubstanz ß-Methyl-$\Delta^{\alpha,\beta}$-butenolid war noch von einer früheren Arbeit[52)] vorhanden. Nach erneuter Fraktionierung in einer Mikrodestillationsapparatur werden verschiedene Fraktionen auf Identität geprüft. Als einziges Vergleichsmaterial liegen ein IR- und ein GC-Spektrum vor (Abb.81a,b, 82). Die IR-Spektren stimmen weitgehend überein. Im GC sind Spuren von möglichen Zersetzungsprodukten vorhanden. Die Substanz ist offensichtlich leicht verunreinigt. Die Nebenprodukte vernachlässigend wird sie in die Reaktion eingesetzt.

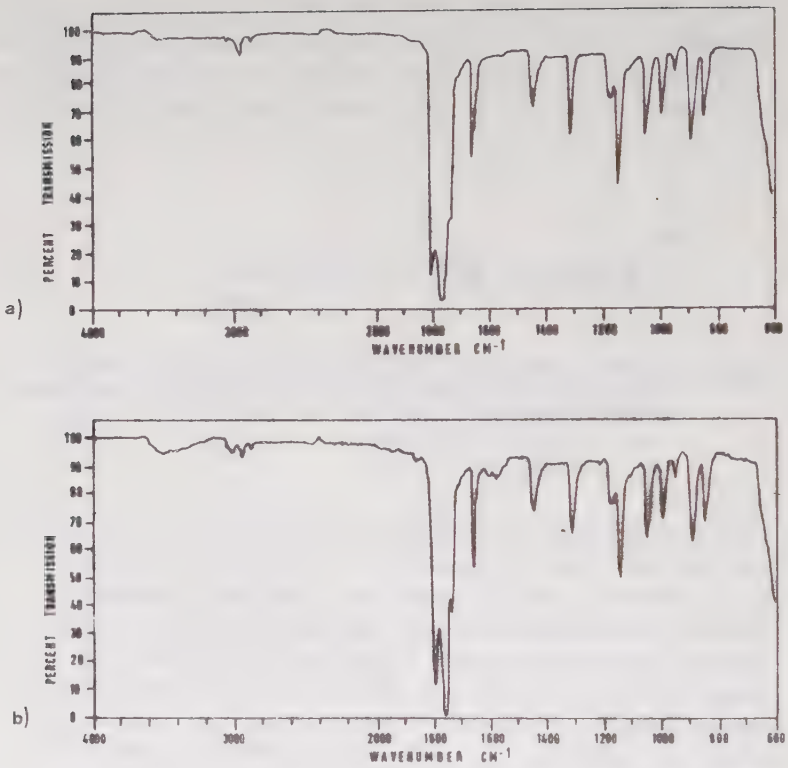


Abb.81: IR-Spektren von ß-Methyl-$\Delta^{\alpha,\beta}$-butenolid in $CHCl_3$
a) aus der Dissertation G.Francas, 1975
b) erneut destilliert

Abb.82: Gaschromatogramm von ß-Methyl-$\Delta^{\alpha,\beta}$-butenolid

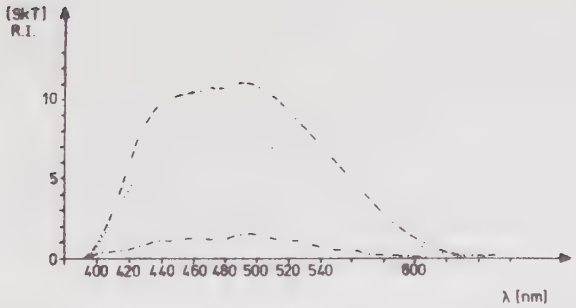


Abb.83: Emissionsspektren einer Butenolidreaktionslösung minus Ethanol-Referenzwert, Meßanordnung A, maximale Verstärkung, Spalt 0,04 mm

·· – ·· 11,2 · 10^{-5} molar

····· 5,6 · 10^{-5} molar

·–·–·– 5,6 · 10^{-6} molar

Eine zu beobachtende Fluoreszenz ist äußerst schwach und erst in noch höherer Konzentration als vorher registrierbar, ungefähr $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ bzw. 10^{-3} molar (Abb.83, 84). Diese Untersuchungen werden aufgrund geringster Fluoreszenzintensitäten nicht weiter verfolgt.

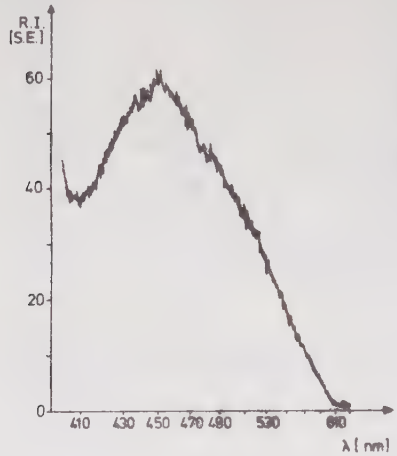
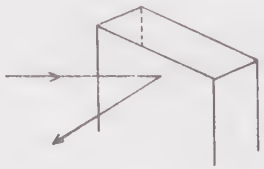


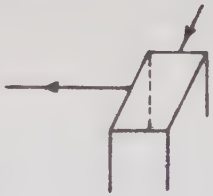
Abb.84: Emissionsspektrum einer etwa $5{,}6 \cdot 10^{-3}$ molaren Butenolidreaktionslösung, Meßanordnung B

1) 365 nm/2,0 mm
2) var. /0,06 mm

Wichtiger erscheint es, den störenden Lampeneinfluß zu beseitigen. Anstelle des runden Quarzglases wird eine eckige Küvette (zwei Seiten Schliff) in den offenen Strahlengang gehalten; zunächst unter einem Winkel von ca. 45°.



Das vom Empfänger registrierte Primärlicht liegt höher als vorher.
Ist die Küvette dagegen im Winkel von ca. 90° eingesetzt, beträgt der Anteil des ankommenden Primärlichtes fast Null wie gewünscht.



Es sind für weitere Messungen nur eckige Küvetten sinnvoll. Die Reflexion des Lichtstrahles an der Glaswand ist bei diesem Einfallswinkel am geringsten. Das Spektrum des Ethanol-Uvasol^{R} besitzt keine Feinstruktur mehr (Abb.85).

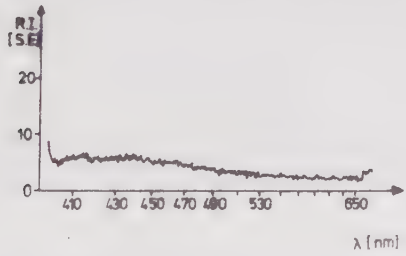
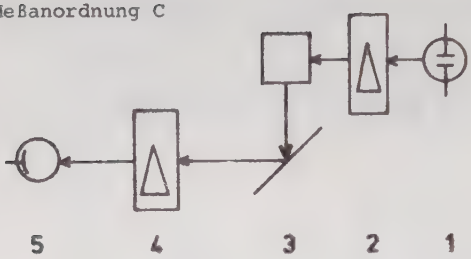


Abb.85: Emissionsspektrum von Ethanol-Uvasol^{R}
1) 365 nm/2,0 mm
2) var. /0,06 mm

Da durch Verwendung eckiger Küvetten das Problem der exakten Justierung nicht beseitigt ist - es gibt keine feste Halterung - muß die Meßanordnung B erneut verändert werden. Die beiden Monochromatoren werden hintereinander aufgestellt.

Meßanordnung C



1 Xenonlampe
2 Monochromator
3 Küvette
4 Monochromator
5 Empfänger

Der Unterschied dieser Anordnung besteht darin, daß eine feste Meßgeometrie herrscht (ZFM 4 Küvettengehäuse) und die Fluoreszenz senkrecht nach unten gemessen wird; dadurch wird ein weitgehendes Ausschalten des Primärlichtes und dessen Reflexion erreicht. Eine "leere" (luftgefüllte) Küvette wird in den Strahlengang gestellt und bei maximal geöffnetem Spalt am Anregungsmonochromator ein Emissionsspektrum aufgezeichnet. Die zuvor beobachtete, von der Xenonlampe herrührende Feinstruktur ist kaum noch erkennbar (Abb.86).

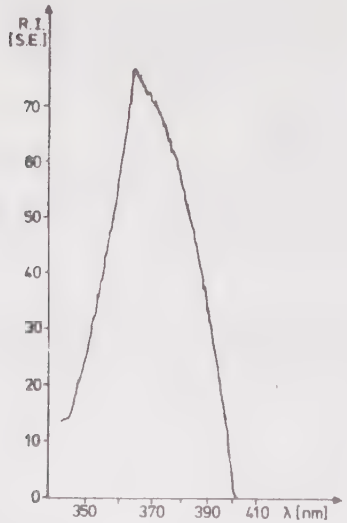


Abb.86: Emissionsspektrum einer leeren Küvette
1) 365 nm/2,0 mm
2) var. /0,06 mm

Als weitere Kontrolle werden Acetophenonreaktionslösungen in solchen Konzentrationen vermessen, deren Fluoreszenzintensitäten im selben Grenzbereich liegen wie die der Digitoxinreaktionslösungen; das bedeutet auch hier maximale Verstärkung am Gerät. Der Lampeneffekt ist fast vollständig ausgeschaltet. Mit der neuen Meßanordnung werden alte Digitoxinreaktionslösungen nachgemessen und das Verschwinden bestätigt.

Einigermaßen vom Referenzwert abweichende Fluoreszenzintensitäten zeigen die 10^{-3} (7,65 mg/10 ml) und die 10^{-2} molare (76,5 mg/10 ml) Digitoxinlösung ($5,6 \cdot 10^{-5}$ bzw. $5,6 \cdot 10^{-4}$ molare Digitoxinreaktionslösung). Es stellt sich die Frage nach einem möglichen linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter Digitoxinkonzentration und Fluoreszenzintensität innerhalb dieses Bereiches. Sieben Lösungen mit steigendem Digitoxingehalt von 10 bis 70 mg/10 ml Ethanol (1.Ansatz) werden hergestellt (55,6 bis 388,9 µg/ml Reaktionslösung) und zweimal in die Reaktion eingesetzt (1. und 2.Versuchsreihe). Die Fluoreszenzintensitäten für drei verschiedene Wellenlängen, die in der Nähe des Maximums liegen, gibt Tab.29 wieder (365 nm Anregung). Da jetzt kein Spektrum aufgenommen werden muß, reicht die einfache Meßanordnung A aus.
Je höher die eingesetzte Digitoxinkonzentration liegt, um so stärker schwankt die Ableseskala des Gerätes. Trotz höchster Dämpfungsstufe fallen die Werte rasch ab. Es wird jeweils genau nach 20 s abgelesen, um etwa gleiche Bedingungen zu schaffen. Der Fluoreszenzstandard F_{53} wird in allen Messungen bei 600 nm auf 100 SkT eingestellt; Verstärkung 10/10/II, Spalt 0,04 mm.

Tab.29: Fluoreszenzintensitäten für verschiedene Digitoxinkonzentrationen
(Zeiss PMQ II, Verst. 10/10/II, Dämpfung III, Spalt 0,04 mm, 365 nm Quecksilberlampe)

Reaktionslösung [ug/ml]	R.I. [SkT] bei 460 nm	450 nm	440 nm
1. Versuchsreihe			
0	16,4	15,4	12,7
55,6	25,1	24,5	22,5
111,1	33,0	33,9	32,0
166,7	38,3	38,3	36,7
222,2	42,7	43,3	42,6
277,8	51,1	52,0	52,4
333,3	55,0	55,4	56,0
388,9	56,0	60,1	59,9
2. Versuchsreihe			
0	17,6	16,4	13,2
55,6	28,2	27,4	24,9
111,1	35,9	35,4	33,2
166,7	44,1	44,1	43,3
222,2	53,5	53,1	51,8
277,8	58,1	59,5	59,2
333,3	61,8	64,8	64,3
388,9	65,1	66,7	66,2

Die Auswertung erfolgte nach der Formel für die lineare Regression $y = a + bx$

$$a = \frac{\sum y_i}{n} - b\frac{\sum x_i}{n} \qquad b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

Darüberhinaus wird noch der Korrelationskoeffizient r berechnet. Das Bestimmheitsmaß liefert eine Angabe über die "Qualität" der Anpassung an die vorgegebenen Daten. Liegt der errechnete Wert für r nahe bei 1,00, so spricht dies für eine gute Anpassung. Ist der Wert dagegen nur wenig von Null verschieden, so ist die Anpassung sinnlos und man sollte eine andere Regressionsart wählen.

$$r = \sqrt{\frac{\left[\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}\right]^2}{\left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}\right]\left[\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}\right]}}$$

Die Berechnung ergibt folgende Werte:

1) unter Berücksichtigung aller acht Meßwerte

a) für die 1. Versuchsreihe

460 nm	$y = 19,48 + 0,10x$	$r = 0,9863$
450 nm	$y = 18,42 + 0,11x$	$r = 0,9913$
440 nm	$y = 15,81 + 0,12x$	$r = 0,9908$

b) für die 2. Versuchsreihe

460 nm	$y = 21,52 + 0,12x$	$r = 0,9837$
450 nm	$y = 20,08 + 0,13x$	$r = 0,9868$
440 nm	$Y = 17,24 + 0,14x$	$r = 0,9855$

2) unter Berücksichtigung der ersten sieben Meßwerte

a) für die 1. Versuchsreihe

460 nm	y = 18,35 + 0,11x	r = 0,9944
450 nm	y = 17,79 + 0,12x	r = 0,9915
440 nm	y = 14,95 + 0,13x	r = 0,9931

b) für die 2. Versuchsreihe

460 nm	y = 20,24 + 0,14x	r = 0,9900
450 nm	y = 18,63 + 0,15x	r = 0,9953
440 nm	y = 15,65 + 0,16x	r = 0,9947

Die Ergebnisse zeigen eine lineare Abhängigkeit in dem sehr engen Bereich zwischen etwa 10^{-3} und 10^{-2} molar (Abb.87a,b). Bereits eine Konzentration von 70 mg/10 ml Ethanol liefert äußerst ungenaue Werte und verschlechtert den Regressionsfaktor zum Teil erheblich. Es ergeben sich für die drei gewählten Wellenlängen unterschiedliche Steigungen. Der Anstieg der Geraden nimmt von 460 nm nach 440 nm zu. Das Maximum des sich bildenden Fluoreszenzproduktes liegt demnach um 440 nm. Die Geraden gehen nicht durch den Ursprung, da die einzelnen Komponenten in der Referenzlösung schon gewisse Fluoreszenz erzeugen.

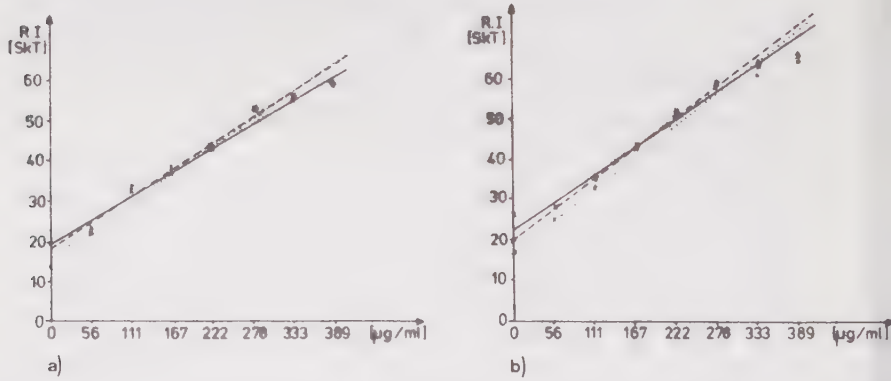


Abb.87: Regressionsgeraden der Digitoxinversuchsreihen bei 460 nm (———), 450 nm (----) und 440 nm (····)
a) 1. Versuchsreihe
b) 2. Versuchsreihe

Bei der Wiederholung der Meßreihe zeigen sich große Schwankungen in den Intensitäten, die zuvor auf eine schlechte Justierung der Küvette zurückgeführt wurden, jetzt aber infolge der fixen Meßgeometrie ausgeschlossen werden müssen. Lediglich für die Digitoxinlösungen aus dem ersten Ansatz liegen die Werte etwa ähnlich (siehe 2. Versuchsreihe). Frisch bereitete Digitoxinlösungen ergeben abweichende Werte. In Tab.30 sind die aus den Spektren entnommenen Maxima und deren relative Fluoreszenzintensitäten aufgeführt.

Tab.30: Lage und relative Fluoreszenzintensitäten der Maxima verschiedener Digitoxinreaktionslösungen

Reaktionslösung	$5{,}6 \cdot 10^{-7}$ M	$5{,}6 \cdot 10^{-6}$ M	$5{,}6 \cdot 10^{-5}$ M	$5{,}6 \cdot 10^{-4}$ M	Ethanol-referenzlösung
λ_{max} [nm]/R.I. [S.E.]					
1.Ansatz	453/5,6	453/4,8	447/10,4	445/11,4	-
2.Ansatz a)	460/2,2	460/2,4	458/3,1	441/6,6	-
b)	459/2,3	458/2,5	456/3,6 437/3,4	437/9,8	-
3.Ansatz	459/2,3	459/2,4	454/3,4 434/3,0	436/10,4	460/2,3

Um zufällig aufgetretene Abweichungen auszuschließen und deshalb eine Reproduzierbarkeit in Frage zu stellen, wird ein Versuch in der Serie durchgeführt. 14 getrennt hergestellte 10^{-2} molare Digitoxinlösungen werden jeweils zu 10^{-3}, 10^{-4} und 10^{-5} molar verdünnt und in die Reaktion eingesetzt. Für die Reihen Nr. 15 und 16 sind die Digitoxinlösungen nochmals aus Nr. 2 und 4 entnommen (Tab.31).

Tab.31: Relative Fluoreszenzintensitäten für Digitoxin-reaktionslösungen verschiedener Konzentrationen [M]

Meßreihe	R.I.[SkT]				
	Ethanol	$5{,}6 \cdot 10^{-7}$	$5{,}6 \cdot 10^{-6}$	$5{,}6 \cdot 10^{-5}$	$5{,}6 \cdot 10^{-4}$
450 nm:					
1	17,5	94,8	17,0	18,4	62,3
2	17,6	74,8	135,0	99,5	101,3
3	18,3	19,1	29,1	32,3	71,5
4	19,2	227,0	208,0	271,0	208,0
5	17,8	18,7	19,6	26,8	78,0
6	18,5	41,4	85,1	63,1	75,0
7	18,5	124,0	123,0	176,0	123,0
8	19,3	19,3	19,6	27,1	76,0
9	18,8	120,0	162,0	103,0	67,2
10	18,3	26,4	24,0	28,0	72,0
11	17,5	47,1	54,3	63,3	76,8
12	17,8	81,5	107,5	81,1	83,2
13	17,6	18,3	19,3	25,3	62,3
14	18,9	20,2	24,0	29,2	69,0
15	17,7	81,5	149,0	115,0	95,3
16	19,1	212,0	393,0	265,0	190,0

Bei fünf (Nr.3,5,8,13,14) von 16 Meßreihen ergeben sich ähnliche Werte. Alle anderen zeigen ein völlig unterschiedliches Verhalten. Digitoxinlösungen aus derselben Verdünnungsreihe liefern reproduzierbare Ergebnisse (Nr.2/15, Nr.4/16). Es fällt besonders auf, daß die Ethanol-Vergleichslösungen kaum voneinander abweichen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Fluoreszenzintensitäten in Skalenteilen betragen bei Ethanol-Vergleichslösungen:

450 nm: $\bar{x}$ = 18,3 SkT s = 0,6 SkT VK = 3,28%

Bei den Messungen ist zu berücksichtigen, daß die Werte der $5{,}6 \cdot 10^{-4}$ molaren Reaktionslösungen starken Schwankungen unterworfen und dadurch mit einem großen Fehler behaftet sind. Alle Reaktionslösungen werden unter gleichen Bedingungen hergestellt. Ein einziger Unterschied liegt in der Aufbewahrung der Digitoxinverdünnungen in Schnappdeckelgläsern im Gegensatz zum Ethanol, welches direkt aus der Ethanol-Originalflasche entnommen wird. Möglicherweise verursachen

Spuren von gelösten Weichmachern aus den Schnappdeckeln oder den Plastikstopfen der Meßkolben diese Unterschiede. Es werden fünf Gläser mit demselben Ethanol gefüllt und mehrere Tage unter verschiedenen Bedingungen stehen gelassen. Die Messung erfolgt nach einem und nach vier Tagen (Tab.32).

Tab.32: Relative Fluoreszenzintensitäten der Reaktionslösungen aus unterschiedlich aufbewahrtem Ethanol

Reaktionslösung	R.I. [SkT] 450 nm	
	1.Tag	4.Tag
1	18,6	19,8
2	16,1	17,6
3	18,4	18,0
4	18,2	19,1
5	19,0	18,9
6	18,6	18,1

Lösung 1: Glas mit gebrauchtem Schnappdeckel
2: Glas mit neuem Schnappdeckel
3: Glas mit neuem Schnappdeckel
4: Glas mit gebrauchtem Schnappdeckel auf dem Kopf stehend
5: Glas mit neuem Schnappdeckel auf dem Kopf stehend
6: Ethanol aus der Originalflasche

Die Mittelwerte und Standardabweichungen betragen (Tab.33):

Tab.33: Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten aus Tab.32 bei 450 nm

	1.Tag	4.Tag
$\bar{x}$	18,2 SkT	18,2 SkT
s	1,0 SkT	1,0 SkT
VK%	5,5	5,5

Die unterschiedlich aufbewahrten Ethanollösungen und das Ethanol aus der Originalflasche liefern einheitliche Fluoreszenzintensitäten (Tab.32,33). Veränderungen durch den Kontakt mit Plastikmaterial werden in diesem Fall nicht beobachtet.
Eine zuverlässige Erklärung für das Auftreten der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten bei anscheinend gleichen Bedingungen kann nicht gegeben werden.

10. Literaturverzeichnis

1) K.-A.Kovar, G.Francas und R.Seidel, Arch.Pharm. 310, 40 (1977).
2) K.-A.Kovar und U.Schwiecker, Arch.Pharm. 307, 384 (1974).
3) K.-A.Kovar und F.Schielein, Arch.Pharm. 311, 73 (1978).
4) W.Zimmermann, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 233, 257 (1935), 245, 47 (1937) und 300, 141 (1955).
5) A.Ellinger, R.Seidel und K.-A.Kovar, Arch.Pharm. 309, 603 (1976).
6) K.-A.Kovar und B.Biegert, Arch.Pharm. 309, 522 (1976).
7) K.-A.Kovar, D.Linden und E.Breitmaier, Arch.Pharm. 314, 186 (1981).
8) K.-A.Kovar und D.Linden, Pharm.Acta Helv. 58, 66 (1983).
9) H.Nakamura und Z.Tamura, Anal.Chem. 50, 2047 (1978).
10) J.W.Huff, J.Biol.Chem. 167, 151 (1947).
11) J.W.Huff und W.A.Perlzweig, ibid. 167, 157 (1947).
12) N.Levitas, J.Robinson, F.Rosen, J.W.Huff und W.A.Perlzweig, ibid. 167, 169 (1947).
13) F.Kröhnke, K.Ellegast und E.Bertram, Liebigs Ann.Chem. I.Mitteilung 600, 176 (1956) und II.Mitteilung 600, 198 (1956).
14) L.Birkofer und Ch.Kaiser, Chem.Ber. 90, 2933 (1957).
15) E.Breitmaier und G.Bauer, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1977, S.66.
16) ibid. S.217 und 354.
17) J.Eisenbrand, Fluorimetrie, Wissenschaftliche Verlagsgegesellschaft mbH, Stuttgart 1966, S.3
18) H.A.Staab, Einführung in die theoretische organische Chemie, 3.Nachdruck der 4.Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1975,S.401.
19) E.Lippert, Z.Naturforschung 10a, 541 (1955).
20) G.Gauglitz, Manuskript zum Weiterbildungskurs "Praktische Spektroskopie" 1981, S.14.
21) G.G.Guilbault, Practical Fluorescence: Theory, Methods,and Techniques, Marcel Dekker Verl., New York 1973, S.11.
22) Perkin-Elmer & Co GmbH, Einführung in die Fluoreszenzspektroskopie; Angewandte UV-Spektroskopie Heft 4, 1978, S.12.
23) DAB 7 DDR, 1970.
24) H.Auterhoff und K.-A.Kovar, Identifizierungen von Arzneistoffen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 4.Aufl. 1981.

25) F.Kaiser, Chem.Ber. 88, 556 (1955).
26) F.Kaiser, Arch.Pharm. 229, 263 (1966).
27) L.Fuchs, M.Wichtl und H.Jachs, Arch.Pharm. 291, 193 (1958).
28) R.Tschesche, G.Grimmer und F.Seehofer, Ber. 86, 1235 (1953).
29) P.Girkis-Takla und I.Chroneos, The Analyst 104, 117 (1979).
30) B.Isaksson, Acta Chem.Scand. 8, 889 (1954).
31) E.Mutschler, Arzneimittelwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 3.Aufl. 1975, S.333.
32) Decholin^{R}-Literatur des Auslandes, RIEDEL-DE HAEN AG, Seelze und Berlin.
33) Decholin^{R}, CASSELLA-RIEDEL
34) G.L.Szendey, Experientia 15, 278 (1959).
35) V.Svoboda und R.Gerbatsch, Z.Anal.Chem. 242, 1 (1968).
36) H.Kaiser und H.Specker, Z.Anal.Chem. 149, 46 (1956).
37) H.Kaiser, Z.Anal.Chem. 209, 1 (1965) und 216, 80 (1966).
38) L.De Galan, Spectry.Letters 3, 123 (1970).
39) G.Talsky, L.Mayring und H.Kreuzer, Angew.Chem. 90, 840 (1978).
40) J.D.Morrison, J.Chem.Phys. 21, 1767 (1953).
41) R.Kaiser und G.Gottschalk, Elementare Teste zur Beurteilung von Meßdaten, Hochschultaschenbücher B.I. Bd.774, S.22.
42) H.Günther, NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1973.
43) Th.Clerc und E.Pretsch, Studientext, Kernresonanzspektroskopie Teil I: Protonenresonanz, Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1973, S.84.
44) J.C.Meinwald, J.Am.Chem.Soc. 85, 2541 (1963).
45) E.Breitmaier und W.Voelter, ^{13}C-NMR-Spectroscopy, Monographs in Modern Chemistry Bd.5, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1978, S.296.
46) J.W.Blunt und J.B.Stothers, Org.Magn.Reson. 9, 439 (1977).
47) D.Leibfritz und J.D.Roberts, J.Am.Chem.Soc. 95, 4996 (1973).
48) N.S.Bhacca et al.,Varian NMR Spectra Catalog, National Press, USA 1962.
49) L.D.Hall und J.K.M.Sanders, J.Am.Chem.Soc. 102, 5703 (1980).
50) L.D.Hall und J.K.M.Sanders, J.Org.Chem. 46, 1132 (1981).
51) C.F.Koelsch, J.Org.Chem. 25, 164 (1960).
52) Dissertation G.Francas, Tübingen 1975.

Lebenslauf

Geboren:	am 1. Mai 1955 in Worms
Eltern:	Heribert Weidemann, Fahrzeugbauingenieur
	Marianne Weidemann, geb.Ostendorp

Schulischer Werdegang

Grundschule:	Westend-Schule, Worms
	April 1961 bis April 1965
Gymnasium:	Staatl.Eleonoren-Gymnasium, Worms
	April 1965 bis Dezember 1971
	Städt.Gymnasium, Goch
	Januar 1972 bis Mai 1973
Reifeprüfung:	16. Mai 1973

Beruflicher Werdegang

Studium der Chemie:	Universität Düsseldorf
	WS 1973/74 bis SS 1975
Studium der Pharmazie:	Universität Tübingen
	WS 1975/76 bis WS 1977/78
Pharmaziepraktikant:	Europa-Apotheke, Stuttgart
	April 1978 bis April 1979

Pharmazeutische Prüfungen:

1.Abschnitt:	9. September 1976
2.Abschnitt:	15. März 1978
3.Abschnitt:	1o. April 1979
Approbation:	April 1979

Beginn der vorliegenden Arbeit:	April 1979
Abschluß der Arbeit:	März 1983
Wiss.Hilfskraft:	April 1979 bis April 198o
Wiss.Angestellte:	April 198o bis April 1983

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof.Dr.K.-A.Kovar waren die Herren Professoren und Dozenten:

Chemie:	L.Birkofer, W.Kuchen
Physik:	J.van Calker
Pharmaz.Chemie:	H.Auterhoff
Pharmaz.Biologie:	E.Reinhard
Pharmaz.Technologie:	E.Graf, H.Hamacher
Pharmakologie:	H.P.T.Ammon
Biochemie:	J.Schultz
Hygiene, Mikrobiologie:	R.E.Bader